

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ ODPADŮ Z VÝROBY VÍNA PRO POTRAVINÁŘSKÉ A
KOSMETICKÉ ÚČELY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

MARKÉTA VÝMOLOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ ODPADŮ Z VÝROBY VÍNA PRO POTRAVINÁŘSKÉ A KOSMETICKÉ ÚČELY

USE OF WASTES FROM WINEMAKING IN FOOD AND COSMETICS APPLICATIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MARKÉTA VÝMOLOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0952/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Markéta Výmolová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Viliam Hlaváček	

Název bakalářské práce:

Využití odpadů z výroby vína pro potravinářské a kosmetické účely

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše k dané problematice
2. Zavedení a optimalizace potřebných metod
3. Experimentální studie
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Markéta Výmolová
Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá biotechnologickým zpracováním odpadu po výrobě vína, slupek a třapin, pro produkci biolihu a následující využití jako obohacení krmných směsí. Na začátku měření byla provedena kompoziční analýza, a to stanovení sušiny, extrakce oleje ze slupek a stanovení celulózy. V rámci práce byla provedena chemická a enzymatická hydrolýza odpadů. Vzniklé hydrolyzáty se analyzovaly se zaměřením na obsah redukujících sacharidů a antioxidantů, celkových polyfenolů a flavonoidů. Z výsledků vyplývá, že nejlepší předpoklady pro kultivaci kvasinek měly vzorky připravené s koncentrací 50 g/l materiálu hydrolyzované na vodní lázni po dobu 60 minut. Hydrolyzované slupky a třapiny byly využity jako produkční médium pro produkci ethanolu kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae*. U vzorků se stanovovala změna koncentrace glukózy a ethanolu pomocí HPLC. Nejvyšší koncentrace ethanolu ($c = 9,880$ g/l) byla dosažena při fermentaci hydrolyzátu po chemické hydrolýze na vodní lázni.

ABSTRACT

The presented thesis deals with the various types of hydrolysis of waste from the production of wine, parings and bunch-stems for subsequent biotechnological use as enrichment of feeding mixtures and the production of bio-ethanol. A composite analysis was done at the start of the measurements for the determination of dry matter, extraction of oil from the parings and assessment of cellulose in the bunch-stems. As a part of this thesis a chemical and enzyme hydrolysis of waste materials have been performed. In hydrolysates the contents of reducing carbohydrates and antioxidants, polyphenols and flavonoids were analysed. The results showed that the samples with a concentration of 50 g/l of material hydrolysed in a water bath for 60 minutes were the best conditions for cultivating yeasts. Hydrolysed parings and bunch-stems were used as the production medium for the production of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. A change of the concentration of carbohydrates and ethanol in the samples has been measured by HPLC. The sample hydrolysed enzymatically using cellulase exhibited the highest concentration of biomass ($c = 2,140$ g/l), the sample hydrolysed chemically in the water bath formed the highest content of ethanol ($c = 9,880$ g/l).

KLÍČOVÁ SLOVA

Hroznové výlisky, chemická hydrolýza, enzymatická hydrolýza, bioethanol

KEYWORDS

Grape pomace, chemical hydrolysis, enzymatic hydrolysis, bioethanol

VÝMOLOVÁ, M. Využití odpadů z výroby vína pro potravinářské a kosmetické účely. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 54 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucí bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za ochotu, pomoc a rady při zpracování práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Viliamu Hlaváčkoví za trpělivost, pomoc a rady při práci v laboratoři. V neposlední řadě chci taky poděkovat mojí rodině za finanční a morální podporu po celou dobu mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	Technologie výroby vín.....	10
2.1.1	Sklizeň hroznů.....	10
2.1.2	Doprava a příjem hroznů.....	12
2.1.3	Zpracování hroznů.....	12
2.1.4	Úprava moštu	15
2.2	Technologie výroby červených vín	18
2.2.1	Operace se rmutem.....	18
2.3	Sušina.....	20
2.4	Vinný olej	20
2.4.1	Vinný olej v kosmetice.....	20
2.4.2	Vinný olej v potravinářství.....	20
2.4.3	Složky ve vinném oleji	20
2.5	Sacharidy	21
2.5.1	Celulóza.....	22
2.6	Antioxidanty	22
2.7	Ethanol v kosmetice.....	22
2.8	Metody analýzy aktivních látek - HPLC	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1	Použité chemikálie.....	24
3.1.1	Standardní chemikálie	24
3.1.2	Použité enzymy	24
3.2	Použité přístroje.....	24
3.3	Použité mikroorganismy.....	25
3.4	Příprava roztoků	25
3.4.1	Carrezova činidla.....	25
3.4.2	Somogyi-Nelsonova činidla	25
3.4.3	Ostatní roztoky	25
3.5	Materiál.....	26
3.5.1	Úpravy materiálu.....	26
3.6	Stanovení sušiny	26
3.7	Extrakce oleje	26
3.8	Stanovení celulózy.....	27
3.9	Růst na substrátu.....	27
3.10	Stanovení sacharidů	28
3.10.1	Stanovení celkových sacharidů podle Duboise	28
3.10.2	Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyiho-Nelsona.....	28
3.11	Stanovení antioxidantů.....	28
3.11.1	Stanovení celkových polyfenolů	28

3.11.2	Stanovení celkových flavonoidů	29
3.12	Optimalizace množství substrátu	29
3.13	Hydrolýza.....	30
3.13.1	Chemická hydrolýza.....	30
3.13.2	Enzymatická hydrolýza	31
3.14	HPLC	31
4	VÝSLEDKY	32
4.1	Sušina.....	32
4.2	Extrakce oleje	32
4.3	Stanovení celulózy.....	32
4.4	Stanovení sacharidů.....	33
4.4.1	Celkové sacharidy	33
4.4.2	Redukující sacharidy	34
4.5	Stanovení antioxidantů	35
4.5.1	Polyfenoly	35
4.5.2	Flavonoidy.....	35
4.6	Růst na substrátu.....	36
4.7	Optimalizace množství substrátu.....	37
4.8	Hydrolýza	39
4.9	Sledování produkce metabolitů metodou HPLC	41
5	ZÁVĚRY.....	45
6	POUŽITÁ LITERATURA.....	47
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	50
8	SEZNAM PŘÍLOH	51
9	PŘÍLOHY.....	52

1 ÚVOD

Vinařství je již od dávných dob jedním z hlavních odvětví zemědělství v České republice, hlavně na Jižní Moravě. Velké množství obyvatel ani netuší, kolik práce stojí za jednou lahví tohoto zlatavého nápoje, kolik nocí vinaři probdívají, ať už při vinobraní či konečném lahvování.

Technologie zpracování vinné révy se dělí na dva druhy. Rozdíl je ve zpracování bílých a červených hroznů. I když je tento rozdíl minimální, je velmi důležitý [1]. V různých fázích výroby vzniká velké množství odpadu, který by se měl využívat dále. V dnešní době je jedním z hlavních problémů nevyužití a nezpracování „zbytků“ po veškeré výrobě, a proto ročně na skládku odchází tuny zbytečného odpadu, který by mohl být novou surovinou pro jiné produkty.

Při výrobě vína vzniká velké množství odpadů, které se ve většině vinařství už dále nevyužívají. Veškerý odpad jsou hlavně matoliny. Matoliny jsou vlastně výlisoky po získání moštu [2]. Výlisnost moštu se pohybuje mezi 60 - 75 %, záleží na odrůdě a vyzrálosti hroznů. Matoliny tvoří asi z 8 % semena, 10 % stopečky (třapiny), 25 % slupky bobulí a 57 % dřev bobulí [3].

V Itálii se matoliny, převážně z modrých hroznů, využívají na výrobu grappy a ze semínek se lisuje hroznový olej. Grappa je destilát z matolin, které zůstaly po vylisování prokvašeného rmutu. Destilace probíhá v kotli s roštem, kde se odspodu přivádí pára, která matoliny propařuje. Další postup se podobá postupu při výrobě jiných pálenek. Zbytek po výrobě grappy se vysuší a poté se využívá jako palivo pro vyvíječe páry nebo se usuší na pokrutiny pro skot [3].

Další využití matolin je při výrobě náhražky vína, tzv. druháku. Je vyroben macerací matolin ve vodě, cukřením roztoku sacharózou (asi 22 kg/100 l) a zakvašením kvasinkami. Jakmile je druhák prokvašený, musí se ještě upravit chuť kyselinou vinnou, případně se můžou přidat aromatické látky. Druhák se nemůže prodávat v obchodech, vyrábí se pouze pro potřeby výrobců vína [3].

Nápadů, jak využít odpad, je opravdu mnoho. Výroba bílého a červeného moštu, vinného octu, mouky, čajů, doplňků stravy z kvasnic, které obsahují vitamín B, oleje, želé, bioplynu a dokonce i čokolády nebo extrakce fenolických látek, což jsou vlastně antioxidanty, látky, jejichž molekuly omezují aktivitu kyslíkových radikálů. Fenolické látky analyzované ve slupkách PINOT NOIR hroznů kapalinovou chromatografií (HPLC), byly kyselina gallová, katechin a kvercetin [4].

Vinný olej se vyrábí z jaderek hroznů. Z každých dvou tun sklizených hroznů se vylisuje až 1500 litrů vinného moštu, ze kterého se pak vyrábí víno. Z matolin se odseparují zrníčka. Ta se musí do 34 hodin vysušit, protože by jinak zplsnivěla. Ze dvou tun hroznů zůstane okolo 50 kg pečiček, z nichž se vylisuje 5 – 10 litrů oleje. Vinný olej má vysoký kouřový bod a tím pádem se nepřepaluje a lze jej použít opakovaně [5].

Mouka se získává vysušením jadérek, z nichž se vylisuje vinný olej a poté rozdrčením zrníček vznikne kvalitní, bezlepková mouka, která má vysoký obsah antioxidantů [6] [7].

Zajímavý způsob, jak využít matoliny, jsou vinné lázně v Hustopečích. Jako jediné v České republice využívají tyto lázně matoliny nebo matolinový sirup jako peeling či vinný zábal [8].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Technologie výroby vín

Základním krokem výroby vína je vypěstování zdravých a kvalitních hroznů. Jsou to biochemické procesy probíhající v révovém keři. Kvalitu hroznu určují anorganické a organické látky vyskytující se v bobulích [9].

2.1.1 Sklizeň hroznů

Sklizeň tvoří asi 30 % celkového času výroby vín.

V průběhu sklizně může dojít k poškozením hroznů. Hrozny se mohou pomačkat, dochází k tomu, že se mošt uvolňuje dříve a může tak být infikován bakteriemi nebo kvasinkami. Toto hrozí i při sběru v teplejších částech dne, v hroznech vznikají nežádoucí látky a tak může vzniknout víno s chorobami [10].

Také plísňe, které vznikají přímo na vinici, jsou velkým problémem. Nejčastěji se vinaři setkávají s hnilobou šedou [10].

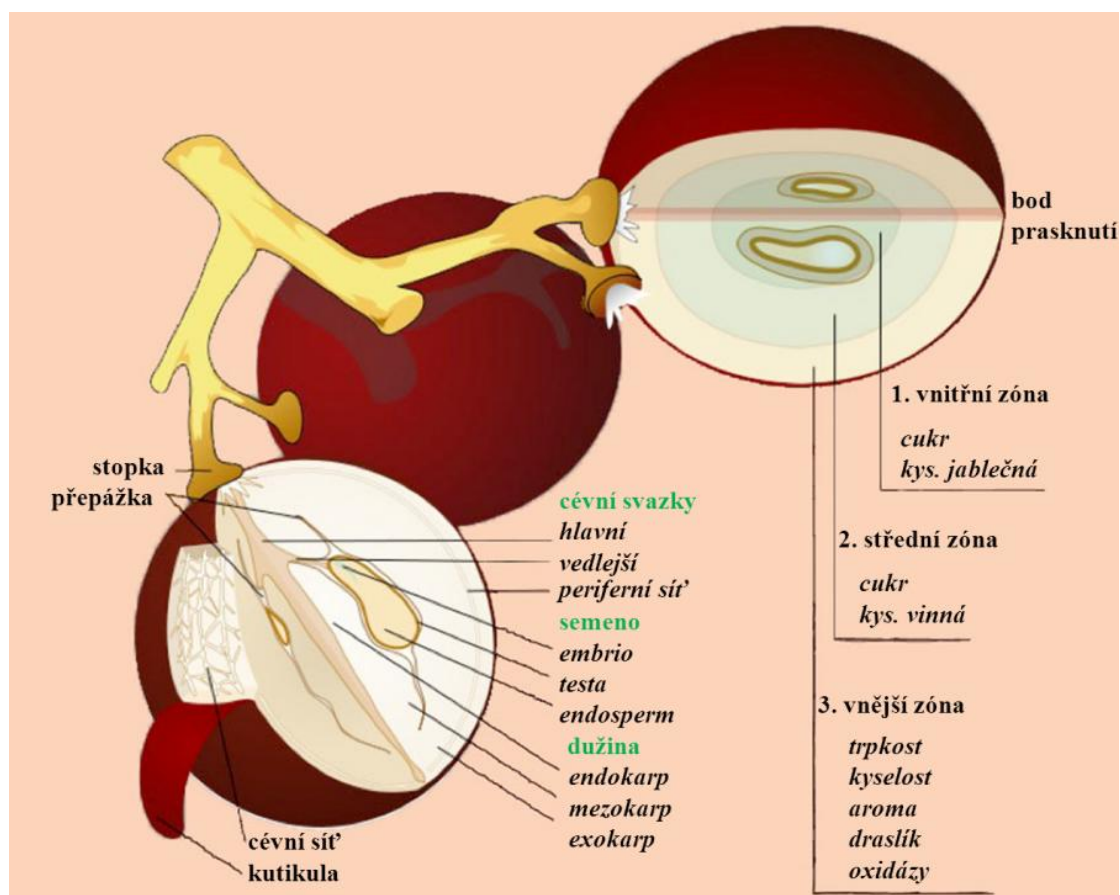
Větší nebezpečí hrozí u modrých odrůd, protože se při maceraci rmut dostává přímo do kontaktu s hnilobou a bakteriemi. Menší odrůdy znamenají vyšší obsah barviv a jemnost taninů v semenech [10].

2.1.1.1 Složení hroznu

Bobule:

- vosková vrstva – potahuje celou bobuli a chrání ji před mechanickým poškozením
- slupka – je odpovědná za mechanickou pevnost a ochranu. Obsahují většinou velké množství fenolických látek, minerálních látek, pektinů, proteinů a hroznových enzymů
- dužnina – jedná se o velmi velké buňky (180 μm). Mají velmi slabé a málo stabilní stěny; nachází se v nich největší množství šťávy. Hlavními složkami jsou cukry glukóza a fruktóza a kyseliny vinná a jablečná
- pečičky – mohou vínu dodat hořkou a škrablavou chuť [1].

Třapina je stopka s hlavní a vedlejšími osami. Může také způsobit hořkou chuť, proto je velmi důležité se vyvarovat jejich poškození a vyluhování [1].



Obrázek 1. Složení hroznů [11]

2.1.1.2 Zrání hroznů

Během zrání se zvyšuje obsah cukrů ve šťávě bobulí. Současně se snižuje obsah veškerých kyselin. Kyselina jablečná je oxidována na cukr [1].

Rozlišuje se několik stadií vyzrálости:

- buketní zralost (obsah cukru není maximální)
- plná zralost (obsah cukru je maximální, hrozny obsahují veškeré živiny a barviva)
- přezrálость a nedostatečná vyzrálость (je způsobena suchem) [1].

Zrání hroznů mohou doprovázet nejrůznější hniloby, které podporují hlavně srážky a vysoké teploty.

Mezi nejčastější druhy hniloby v nezralých bobulích patří:

- hniloba kyselá a penicilinová (napadení po poškození)
- v případě zralých bobulí hniloba šedá (k napadení dochází při vlhkém počasí, již v době kvetení, napadená místa se zbarvují hnědě)
- ušlechtilá hniloba (k napadení dochází při teplém počasí, může docházet i k odbourávání kyselin) [1].

2.1.1.3 Příprava na sklizeň

Pouze včasná a řádná příprava na sklizeň je předpokladem bezproblémové sklizně hroznů. Často je nutno sklizeň zahájit dříve, než je naplánováno. Proto je vhodné včas provést nátěry

ocelových tanků a ostatních nádob, doporučuje se provést zkušební provoz zařízení a kontrolu čistoty hadic a odstranit z nádob vinný kámen [1].

2.1.1.4 Doba sklizně

O termínu sklizně rozhoduje několik faktorů, jako je vyzrálost hroznů, zdravotní stav hroznů nebo požadovaný typ vína. Správnou dobu sklizně tedy neurčuje jen obsah cukru, ale i obsah kyselin (např. u Müller Thurgau, Tramínu nebo Rulandského šedého). Je potřeba dosáhnout plně vyzrálých hroznů, kde slunečné počasí a dostatek srážek může urychlit příchod plné zralosti. Naopak suché a chladné období způsobuje zpoždění zrání. Zralost hroznů se kontroluje refraktometrem [1].

Doba sklizně se dělí na tři části:

- předsklizeň – sklizeň napadených hroznů,
- hlavní sklizeň,
- odstupňovaná sklizeň – provádí se, pokud jsou hrozny napadeny hnilobou [1].

2.1.1.5 Způsoby provádění sklizně

2.1.1.5.1 Ruční sklizeň

U bílých vín je hraje největší roli cukernatost a aromatická zralost kyselin v moštu [10]. Na hektar vinice se musí počítat 250-300 pracovních hodin [1].

Hrozny se nejčastěji sbírají ručně (hlavně u menších vinařů). Ruční metoda sběru totiž umožňuje i výběr hroznů, které jsou nevhodné, nevyzrálé a ovlivňují kvalitu vína [10].

Správný sběr vína má několik zásad. Bobule musí zůstat nepoškozené, proto se používají nádoby o objemu 10 dm³, maximálně 15 dm³. Veškeré nádoby musí být ošetřeny mezi sklizní a dalším zpracováním. Důležitým krokem je velmi rychlý přesun ke zpracování. Bílé odrůdy by se měly sklízet v chladnějších částech dne – přehřátí hroznů totiž způsobuje urychlení mikrobiálních činností, ideální teplotou je 15 °C. Modré odrůdy by se měly na rozdíl od bílých sklízet v těch teplejších částech dnů, při teplotě asi 20 °C [10].

2.1.1.5.2 Mechanizovaná sklizeň

Mechanizovaná sklizeň sníží dobu sklizně na 3 až 4 hodiny na hektar. K oddělení bobulí dochází na základě vibrací plastových tyčí v zóně hroznů v horizontálním směru. Listy a třapiny jsou odstraněny proudem vzduchu z ventilátoru [1].

2.1.2 Doprava a příjem hroznů

Hrozny by měly být dopraveny z vinice do místa zpracování co nejdříve a hlavně nepoškozené, proto se klade důraz na výšku vrstvy hroznů a dopravní vzdálenost [1].

2.1.3 Zpracování hroznů

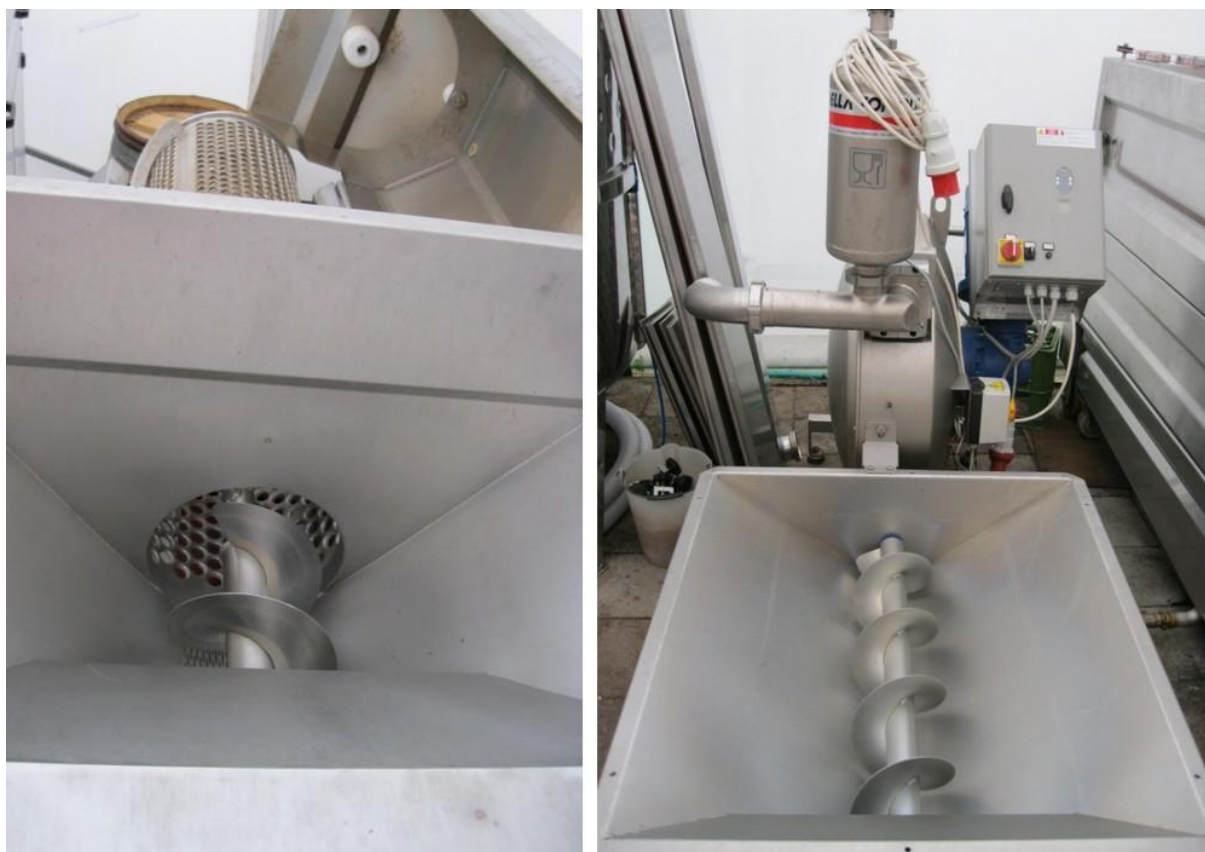
Kvalitu vína nejvíce ovlivňuje, až z 80 %, způsob zpracování hroznů a získávání moštu. Doba mezi sklizní a začátkem alkoholového kvašení je zhruba dva dny. Během tohoto času musí proběhnout řada operací, které ovlivňují hotové víno [1].

2.1.3.1 Odstopkování, mletí, drcení a odzrnění hroznů

Důležitou součástí je odstranění třapin hroznů, protože způsobují hořké chuťové tóny a pachuti ve víně. Hrozny se buď úplně rozemelou, nebo alespoň rozdrtí, čímž dojde k částečnému narušení bobulí. To má pozitivní vliv na kvalitu vína [12].

Může se použít i technologie, která lisuje celé hrozny. Tím se dostávají aromatická vína, která ale obsahují nižší obsah fenolických látek (nižší stabilita vína). Jsou proto určena pro brzkou konzumaci, nejlépe v prvním roce po výrobě [10].

Pro lepší kvalitu vína je nezbytné používat místo mlýnku, který hrozny s třapinami pouze rozemele, tzv. mlýnkoodzrňovač (*Obrázek 2*), který, na rozdíl od mlýnku, oddělí hroznové bobule od třapin. V mlýnkoodzrňovači dochází prvně k odstopkování, což znamená oddělení třapin od hroznů [1]. Třapiny poté vypadnou mimo nádobu, do které padají rozemleté hrozny (*Obrázek 2* – slouží k přesunu hroznových bobulí z mlýnkoodzrňovače do lisu – nejšetnější čerpadlo vůči bobulím). Bobule, které jsou po pomletí už úplně rozrušené, uvolňují mošt [10].



Obrázek 2. Mlýnkoodzrňovač (nalevo) a šnekové čerpadlo [13]

2.1.3.2 Sírění

Přídavek oxidu siřičitého tlumí oxidační enzymy, divoké kvasinky a bakterie a vyvazuje vzdušný kyslík. Čím dříve se síření provede, tím lépe je rmut chráněn před účinky vzduchu a zhnědnutí a podpoří se vývoj čistých tónů [1].

Provádí se nejčastěji pomocí prášku pyrosulfitu draselného ($K_2S_2O_5$), který se aplikuje přímo na hrozny, aby během odstopkování a drcení došlo k promísení. Používá se i tekutý

oxid siřičitý (přidává se do moštu), avšak zde je nutné zakoupení licence na práci s jedy. Rozlišují se dávky pro zdravé, nahnilé a botrytické hrozny. Nižší dávky, než jsou doporučeny, jsou možné při zdravých a dobře vyzrálých hroznech, chladném počasí během sklizně a rychlém zpracování hroznů [1].

2.1.3.3 Ohřev a chlazení rmutu

Ohřev je nutný hlavně u rmutů pro přípravu červeného vína na teplotu kvašení nebo za účelem zvýšení uvolňování barviva. Musí následovat okamžité lisování, ochlazení a kvašení moštu. Tato operace se provádí v případě nezdravých hroznů – zabrání se delšímu kontaktu moštu s nezdravými hrozny [1].

Rmut se chladí přibližně na 5 °C. Delším ponecháním (u červených vín až několik dnů) při této teplotě se dosáhne větší ovocné chuti [1].

2.1.3.4 Kvašení rmutu

Alkoholové kvašení je základem technologie výroby vína. Je to nejdůležitější biochemický proces. Vyžaduje velmi důslednou kontrolu jeho průběhu [10].

Rozlišují se dva druhy kvašení moštů – spontánní a řízené [10].

2.1.3.4.1 Spontánní kvašení

Vína při spontánním kvašením potřebují delší čas na výrobu, aby kvalitně uzrála. Zároveň se vytváří široké spektrum aromatických látek [10].

Při spontánním kvašení je důležitá přesná dávka oxidu siřičitého. Dávka by neměla překročit 50 mg/l. Avšak aplikace oxidu siřičitého není podmínkou, jedná-li se například o zdravé hrozny [10].

Spontánní kvašení je vhodné pouze pro dokonale vyzrálé hrozny a pro hrozny s vynikajícím zdravotním stavem. Nejlepší je sklizeň hroznů při nízkých teplotách. U aromatických odrůd je vhodná doba macerace 6 – 8 hodin při 10 – 15 °C z důvodu uvolnění aromatických látek [10].

Při odkalení se odstraní pouze nejhrubší kal. Kalové částice obsahují divoké kvasinky a taky „pravé“ vinné kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) [10].

Spontánní kvašení následuje po úpravě cukernatosti. Při kvašení je nutno dodržovat úplnou čistotu ve sklepě. Teplota by neměla překročit 18 °C. Spontánní kvašení začíná ve vinném sklepě, kde už nějaké víno kvasí. Pokud nezačne kvašení do dvou týdnů, je nutná aplikace aktivních suchých vinných kvasinek. Kvašení, které je delší než měsíc, má nežádoucí vliv na výslednou kvalitu vína. Můžou se totiž objevit nežádoucí bakterie a kvasinky nebo může dojít k rozvoji různých chorob a vad vína. V situaci, kde je kvašení přerušeno vlivem fyzikálních či chemických dějů, není taktéž vhodné kvašení obnovit [10].

Po ukončení kvašení se mladé víno stočí z kalu. U kategorie pozdní sběr se nechá proběhnout úplné prokvašení – cukr se kvašením zcela proměnil na alkohol a oxid uhličitý. Vína připravena touto metodou jsou hotová mnohdy až v květnu. Jsou velmi aromatická, výrazná, mají lepší chuť [10].

2.1.3.4.2 Řízené kvašení

Řízené kvašení probíhá tak, že se aktivní vinné kvasinky aplikují do moštu a teplota se řídí po celou dobu kvašení. Teplota při kvašení má velmi významný vliv na výslednou kvalitu vína.

Kvasinky se rozdělují do několika skupin:

1. kvasinky zvýrazňující charakter odrůd (Ryzlink rýnský, Sauvignon),
2. kvasinky pro aromatické odrůdy,
3. kvasinky pro vína určena pro konzumaci do Vánoc,
4. kvasinky pro plná vína [10].

Teploty alkoholového kvašení by neměly přesáhnout teploty 25 °C. Při vyšších teplotách by docházelo k velmi rychlému kvašení a ke ztrátě alkoholu a aromatických látek. Při překročení teploty 30 °C dochází k neúplnému prokvašení. Vína mají potom menší obsah alkoholu a vysoký obsah zbytkového cukru. Dnes se ideálně provádí technologie chladného kvašení. Teplota se pohybuje mezi 13 – 18 °C, kvašení trvá delší dobu. Pokud se ve vínu ponechá větší obsah zbytkového cukru, tak bude víno obsahovat vyšší obsah alkoholu [10].



Obrázek 3. Řízené kvašení [13]

2.1.4 Úprava moštu

Následující zásahy v období mezi sklizní a kvašením ovlivňují budoucí charakter vína.

2.1.4.1 Provzdušnění a síření

Provzdušněním moštu se podporuje množení kvasinek, čímž i kvašení, ale taktéž zvýšení vlivu nežádoucích bakterií. Provzdušnění se provádí v případě přesířeného moštu nebo nahnílých hroznů [1].

Síření je nutno provádět v případě delšího stání moštu, velmi vysokých teplot při sklizni nebo nahnilých hroznů [12].

2.1.4.2 Macerace

Macerace je technologický proces výroby vína, při kterém se uvolňují látky obsažené ve slupkách bobulí do moštu ještě před fermentací. Cílem macerace je lepší extrakce aromatických látek, které jsou vázány ve slupkách a těsně pod nimi. O použití macerace rozhodují některé faktory – odrůda vinné révy, typ vína a vyzrálость hrozny. Nevyzrálé hrozny můžou způsobit hořká a trpká vína nebo bakteriální nedostatky [10].

Kvalitní macerace vyžaduje studené hrozny, které jsou zbaveny třapin, listů a úlomků letorostů. Délka macerace by měla trvat 12 – 20 hodin. Existují i vína, která vyžadují jinou dobu. Důležité je dodržovat teplotu 10 – 15 °C a nepřítomnost kyslíku, protože tyto podmínky zajistí optimální extrakci aromatických látek a minimální extrakci trpkých či hořkých fenolických látek [10].

Následuje lisování hroznů a odkalení moštu, který se připraví na alkoholové kvašení. Vína, která prochází macerací, obsahují více aminokyselin, které způsobují rychlý začátek kvašení. Mají také vyšší obsah polysacharidů a bílkovin, díky čemuž je složitější vína stabilizovat proti bílkovinným zákalům [10].

Macerace se může provádět u mnoha odrůd – aromatických muškátových odrůd (Muškát moravský, Irsai Oliver), kde je důležité dodržet nízkou teplotu 10 °C a krátkou dobu macerace 6 hodin; aromatické tramínové odrůdy (Tramín, Pálava), doba macerace je 6 – 12 hodin a u ostatních odrůd (Ryzlink rýnský, Ryzlink vlašský, Sauvignon), kde je doba macerace delší, až 24 hodin [3].

2.1.4.3 Odkalení

Vylisováním se získá mošt, který má vždy určenou míru zakalenosti. Zůstávají v něm zbytky semen z bobulí, zbytky slupek, dužniny i třapin [10].

Odkalení moštu je velmi důležitá část technologie výroby. O tvorbě kalových částic rozhoduje i obsah polysacharidů v moštu [10].

Neodkalené mošty způsobují určité komplikace: zvýšenou potřebu oxidu siřičitého; rychlé a prudké kvašení; chlazení moštů; dochází ke zhoršení filtrovatelnosti vína a vzniku chorob vína vlivem plísní, bakterií, kvasinek [1].

Avšak určité množství ponechaného kalu je taky důležité. Nacházejí se v nich mastné a minerální látky, které slouží jako výživa kvasinek. Jemný kal je zdrojem kvasinkové mikroflóry. Moderní typ vína vyžaduje přesný stupeň odkalení a odkalení moštu zlepšuje fermentační aroma bílých vín [10].

Odkalení se provádí sedimentací v úzkých vysokých nádobách (*Obrázek 4*). Nesmí ještě docházet ke kvašení, aby se kalové částice mohly usadit na dno. Proto se musí mošt ještě zasířit, kvašení se totiž zdrží, protože oxid uhličitý částice nadnáší. Ideální odkalení trvá 12 – 24 hodin podle stupně znečištění. Po skončení sedimentace se kal odpustí a čistý mošt se převede do jiné, připravené nádoby – nerezového tanku (*Obrázek 4*) [10].



Obrázek 4. Odkalovací nádoba (vlevo) a nerezový tank [13]

2.1.4.4 Úprava cukernatosti a obsahu kyselin

Měření cukernatosti se provádí už ve vinici pomocí ručního refraktometru. Při měření se měří bobule z různých částí vinice, z různých keřů a z různých částí hroznů. Výsledná hodnota udává předpokládanou cukernatost. Přesně se cukernatost měří až moštoměrem. Moštoměrem se měří až ve vinném sklepě. Cukernatost se upravuje po odkalení moštu a před začátkem kvašení [10].

Přidávání sacharózy do moštu nenarušuje přirozenost moštů ani vín. Sacharóza je disacharid, který se skládá z glukózy a fruktózy. Musí být nejprve přeměněna na jednoduché cukry, glukózu a fruktózu. Tento děj způsobuje enzym invertáza. Jako kyselé prostředí zde působí kyselina jablečná a kyselina mléčná. Konečným výsledkem je snadno zpracovatelný cukr. Po dvou dnech se sacharóza v moštech nezjistí, úplně se přemění na invertní cukr [10].

2.1.4.5 Ošetření bentonitem, enzymy a funkce aktivního uhlí

Bentonit je hornina, která vzniká zvětváváním mateční horniny z čediče. Vzniká mechanickým a chemickým zvětváváním v alkalickém prostředí. Jsou to zeminy, které obsahují silikáty vápníku, sodíku a hliníku. Obsahuje vysoké množství jílových nerostů. Jedná se o horninu, která má velmi dobrou adsorpční vlastnost vůči rozpuštěným bílkovinným látkám, ale i barviv a rozpuštěných látek ve víně, které ovlivňují chuť.

Bentonitem se odstraňují „termolabilní“ bílkoviny z moštu, případně vína. Čím dříve ošetření bentonitem proběhne, tím méně zatěžuje výsledný produkt [1].

Bentonit se do moštu přidává kvůli lepšímu oddělení kalů. Ošetření bentonitem se používá proto, aby bylo víno stabilní i při změnách teploty [1].

Enzymy se používají při velmi vysokém obsahu pektinů. Enzymy zkracují dobu naležení rmutu, způsobují vyšší úlisnost, lepší odkalení, klidnější průběh kvašení a lepší filtrovatelnost [1].

Aktivní uhlí je adsorpční prostředek, který na sebe váže látky způsobující vůni, chuť a barviva. Použití uhlí má význam v případě nahnilých hroznů, aby se odstranila pachut' po hnilobě. Uhlí by se nemělo účastnit kvasného procesu – část adsorbovaných látek by se uvolnilo zpět [1].

2.2 Technologie výroby červených vín

Na výběru typu červeného vína závisí celé zpracování.

Kvalita vína vzniká již ve vinici. U červeného vína je velmi důležité mít zdravé hrozny. Vadné hrozny způsobují jak problémy při zpracování, tak nižší barva hotového vína. Barvu červeného vína způsobují barviva antokyany. Menší bobule mají větší podíl slupky a i barviva. Na rozdíl od bílých vín, kdy jsou při výrobě nejdůležitější aromatické látky, u červených vín jsou nejdůležitější látky fenolické [1].

2.2.1 Operace se rmutem

2.2.1.1 Ošetření rmutu

Sířením jsou potlačovány octové bakterie a oxidační enzymy, které mohou způsobit problémy s barvou. V případě úplně zdravých hroznů a okamžitého zakvašení je možné síření vypustit. Optimální teplota je kolem 18 °C, protože by kvašení mělo být zahájeno co nejdříve, aby byla potlačena mikrobiologická konkurence [1].

Nezbytností je rychlé zakvašení, k čemuž se používá přídavek čistých kultur kvasinek, s dávkováním není vhodné šetřit. Přídavek cukru se uskutečňuje jednorázově na začátku kvašení. Přídavek pektolytických enzymů urychlí uvolňování barviv z buněk [1].

2.2.1.2 Macerace rmutu

Macerace rmutu (macerace na slupkách, nakvašení) je nejběžnější technologie, která se při výrobě červených vín používá.

Macerace rmutu probíhá pouze při výrobě červených vín. Jedná se o doplňkové vyluhování součástí matolinového klobouku v dokvašeném mladém víně. Tím se ve víně docílí většího množství tříslovin a extraktu [2].

Přítomnost alkoholu ve rmutu rozlišuje tři stadia macerace: předfermentační macerace probíhá několik hodin až dnů, alkohol se tvoří jen málo; v alkoholové kvašení dochází ke zvyšování obsahu alkoholu a současně dochází k extrakci taninů ze slupek a později ze semen a pofermentační macerace trvá osm až třicet dnů a nastává mezi 10 až 16 objemovými procenty alkoholu [10].

V závislosti na množství alkoholu dochází k postupnému uvolňování různých skupin fenolických látek: antokyaninová barviva se uvolňují po rozrušení bobulí při mletí nebo drcení, uvolňují se i v roztoku, který alkohol neobsahuje, k uvolňování dochází v počátečním

stádiu macerace; taniny ze slupek mají nejjemnější chuť, uvolňují se dříve než taniny ze semen a k uvolnění potřebují alkohol, k jejich uvolňování dochází 2. den macerace, obsah alkoholu je až 6%. Taniny ze semen mohou být chuťově ostré, trpké a hořké, což způsobuje vyzrálост hroznů, k uvolnění potřebují vyšší obsah alkoholu, uvolňují se 5. den macerace při obsahu alkoholu 7 a více procent [10].

Teplota v průběhu macerace je základním faktorem. Teploty by se měly pohybovat mezi 28 – 30 °C, avšak pro velmi dobrou extrakci taninů a barviv jsou vhodné teploty 30 – 35 °C, které ale mohou způsobit zvýšenou produkci těkavých kyselin [10].

Macerace v chladném sklepě způsobuje ne zcela ideální chuť, naopak nízké teploty snižují extrakci barviv.

2.2.1.2.1 Macerace v otevřené nádobě

Macerace v otevřených nádobách je nejčastější způsob macerace u vinařů. Může se provádět v dřevěných nebo plastových kádích nebo v nerezových nádobách. Extrakce barviv a taninů se docílí pravidelným mícháním rmutu, obvykle dvakrát denně. Macerace trvá 7 – 30 dnů, záleží na kvalitě hroznů. Jakmile dojde k ostrému projevu taninů, rmut se vylisuje [10].

2.2.1.2.2 Macerace pomocí „sprchování“ moštem

Tato metoda macerace se provádí v nerezové nádobě, která má ve spodní části vývod se scezovacím sítkem. V horní části nádoby je přívod a „sprcha“. Přívod a vývod jsou propojeny hadicí před čerpadlo. Nádoba se naplní rmutem a mošt se jednou denně 2 minuty přečerpává. Tato macerace se provádí okolo 5 dnů [10].

2.2.1.2.3 Výroba ve vinifikátorech

Vinifikátory (*Obrázek 5*) jsou zařízení, která umožňují míchání rmutu a regulaci teploty (tedy ohřevu). Ohřevem s mícháním rmutu dochází k extrakci barviv a macerace se může přesně naplánovat podle druhu vína [10].



Obrázek 5. Vinifikátor [13]

2.3 Sušina

Sušina je neodpařitelný zbytek látky, který zůstane po zahřívání a odpařování, kde teplota nepřekročí 105 °C.

2.4 Vinný olej

2.4.1 Vinný olej v kosmetice

Vinný olej se v kosmetice využívá na pleť. Pleťový vinný olej obsahuje totiž složky, které mají regenerační a hydratační účinky. Kůži dodává hladkost, pružnost a zabraňuje stárnutí. Vinný olej se dobře vstřebává a nezanechává pleť mastnou. V kosmetických prostředcích se používá jako ochrana proti UV záření. Ošetření pleti vinným olejem chrání přírodní kolagen v pokožce [14].

2.4.2 Vinný olej v potravinářství

Olej z hroznových jader je aromatický, má řidší konzistenci. Chuť má ořechovou. Má vysoký bod varu, 220 °C, takže je vhodný ke smažení [14].

2.4.3 Složky ve vinném oleji

Olej z hroznových jadérek se uplatňuje ve farmacii díky obsahu antioxidantů (flavonoidy), obsahuje rovněž vitamín E a vitamín C a beta-karoten [14].

2.5 Sacharidy

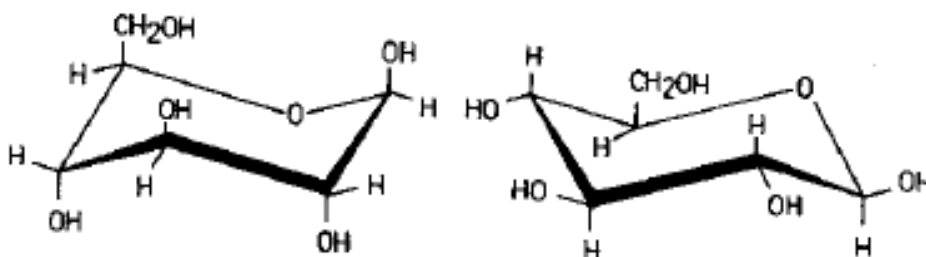
Sacharidy jsou rozsáhlou skupinou přírodních látek. Se svými deriváty se vyskytují v každé buňce. Sacharidy jsou významným zdrojem energie v živých systémech. Jsou to základní stavební složky buněk a tkání. Zásadní úlohu při vzniku sacharidů má fotosyntéza, která poskytuje glukózu. Glukóza se se svými deriváty uplatňuje ve vzájemné přeměně sacharidů a v řadě katabolických pochodů (např. kvašení) [15] [16].

Základem struktury sacharidů jsou alifatické polyhydroxykarbonylové sloučeniny (aldehydy a ketony) – monosacharidy. Spojováním jednotek monosacharidů vznikají oligosacharidy (2-10 jednotek) a polysacharidy (11 a více jednotek monosacharidů) [15] [16].

Přehled sacharidů:

Monosacharidy – základem je alifatický uhlíkový řetězec, který obsahuje jednu karbonylovou skupinu a skupiny hydroxylové na všech ostatních atomech uhlíku. Pokud je karbonylová skupina na primárním atomu uhlíku, sacharid se nazývá aldóza, je-li na sekundárním atomu uhlíku, jedná se o ketózu [15].

Podle uspořádání substituentů na asymetrickém uhlíku se rozeznávají dvě konfigurace. U „D“ řady se hydroxylová skupina na tomto asymetrickém uhlíku píše vpravo, u „L“ se píše vlevo. Cyklizací vzniká asymetrický chirální uhlík – formy α a β [15].



Obrázek 6. α -D-glukopyranóza a β -D-glukopyranóza [15]

Nejdůležitější hexózou je glukóza – hroznový cukr. Rostliny si glukózu vyrábí fotosyntézou z vody a oxidu uhličitého, živočichové ji získávají z potravy. Fruktóza, ketohexóza, je monosacharid obsažený hlavně v ovoci [16].

Disacharidy – skládají se ze dvou stejných nebo různých monosacharidů spojených glykosidickou vazbou mezi α - nebo β -hydroxylovou skupinou monosacharidu a libovolnou hydroxylovou skupinou jiného monosacharidu. Redukující – zůstává-li ve vzniklé molekule disacharidu alespoň jeden poloacetalový hydroxyl volný (např. maltosa, laktosa). Neredukující – jsou-li všechny poloacetalové hydroxylové skupiny blokovány vazbou (např. sacharosa) [15] [16].

Oligosacharidy – obsahují 2 – 10 monosacharidových jednotek.

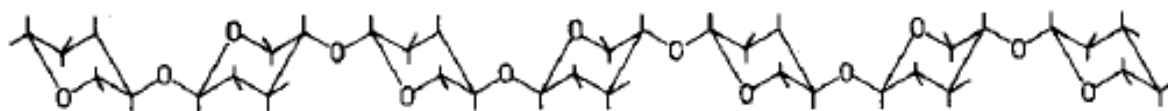
Polysacharidy – jsou složeny z velkého množství monosacharidových jednotek spojených glykosidovými vazbami do lineárních nebo rozvětvených řetězců. Dělí se na homoglykany (jsou-li tvořeny z jednoho druhu monosacharidu) a na heteroglykany (skládá-li se molekula z více druhů monosacharidů). Jejich biologický význam je zásobní a stavební. Patří sem škrob, glykogen, celulóza, chitin [15].

Složené polysacharidy, neboli glykokonjugáty, jsou sloučeniny, které vznikly kovalentní vazbou sacharidů na molekuly proteinů nebo lipidů. Mezi glykokonjugáty patří proteoglykany, glykoproteiny, glykolipidy [15].

2.5.1 Celulóza

Celulóza je nejrozšířenější organická látka na Zemi. Její nerozvětvený řetězec obsahuje cca 3 000 zbytků β -D-glukopyranózy spojených vazbami β -1-4 – *Obrázek 7*. Tvoří hlavní část podpůrných pletiv rostlin a potravy býložravců. Enzymová hydrolýza je velmi obtížná z důvodu sterické zábrany přístupu enzymu a pro složitou stavbu makroskopických vláken celulózy, ve kterých jsou jednotlivé molekuly spojeny vodíkovými vazbami tak těsně, že tvoří mikrokrytalickou strukturu.

V přírodě se vyskytuje ve směsi s látkami nesacharidové povahy a dalšími polysacharidy, které se souhrnně označují jako hemicelulózy [15] [16].



Obrázek 7. Struktura celulózy [15]

2.6 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, jejichž molekuly omezují aktivitu kyslíkových radikálů. Omezují proces oxidace v organismu nebo ve směsích, kde se vyskytují, proto se přidávají do potravin, které se oxidací příliš poškozuji (např. rostlinné oleje – žluknutí) [17].

2.7 Ethanol v kosmetice

V kosmetice ethanol slouží jako konzervační látka. V kosmetice se používá melasový ethanol, který se u nás získává zkvašováním cukerného roztoku z brambor. Ethanol působí antimikrobiálně. Přidáním do kosmetického přípravku působí jako nosič aktivních látek. Nevýhodou může být, že ve vysokých koncentracích může pokožku dráždit a vysušovat [18].

2.8 Metody analýzy aktivních látek - HPLC

Chromatografie je separační metoda, kde se oddělují složky, které jsou ve vzorku. Je to metoda kvalitativní a kvantitativní. Princip chromatografie je takový, že se vzorek vnáší mezi dvě navzájem nemísitelné fáze. Jedna fáze je nepohyblivá, stacionární, přes kterou se pohybuje druhá fáze, a to mobilní. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi jsou složky vzorků odnášeny na základě toho, jak pevně jsou vázány na stacionární fázi. Složky, které se vážou málo, odchází první, ty, které jsou stacionární fázi zdržovány více, odchází jako poslední. Tímto pohybem se složky vzorku od sebe oddělí [19].

U kapalinové chromatografie je mobilní fází kapalina. O separaci vzorku rozhoduje složení mobilní fáze [19].

Vysoké účinnosti a rychlosti se u HPLC (vysokotlaká kapalinová chromatografie) dosáhne velkými průtoky a vysokými tlaky mobilní fáze a krátkých kolon plněných náplněmi z jemných částic. Pohyb eluentu umožňuje vysokotlaké čerpadlo [19].

K detekci slouží hlavně spektrofotometrické detektory, které jsou jednoduché a lze jimi detekovat velký počet látek [19].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Hexakynoželezitan draselný, p.a., Lachema s.r.o.
Octan zinečnatý dihydrát, p.a., Lach-ner
Kyselina octová 99,8 %, p.a., Lach-ner
Uhličitan sodný bezvodý, p.a., Lach-ner
Hydrogenuhličitan sodný, p.a., Lach-ner
Síran sodný bezvodý, p.a., Lach-ner
Vinan sodno-draselný tetrahydrát, p.a., Lach-ner
Síran měďnatý pentahydrát, p.a., Lachema s.r.o.
Molybdenan amonný tetrahydrát, p.a., Lachema s.r.o.
Kyselina sírová 96 %, p.a., Lach-ner
Folin-Ciocalteuovo činidlo, VWR Chemicals
Dusičnan sodný, p.a., Lach-ner
Chlorid hlinitý, p.a., Lach-ner
Hydroxid sodný mikroperly, p.a., Lach-ner
Hexan, VWR CHEMICALS
Kyselina dusičná, p.a., Lach-ner
Ethanol, p.a., Lach-ner
D – glukóza, p.a., Lach-ner
Kvasničný extrakt, HIMEDIA
Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a., Lach-ner
Síran hořečnatý heptahydrát, p.a., Lach-ner
Síran amonný, p.a., Lach-ner
Kyselina chlorovodíková 35 %, p.a., Lach-ner
Fenol, p.a., Lach-ner
Dusitan sodný, p.a., Lach-ner

3.1.1 Standardní chemikálie

Kyselina gallová, Sigma-Aldrich
Katechin, Sigma-Aldrich

3.1.2 Použité enzymy

Na enzymatickou hydrolýzu se použil celulózový komplex NS-50013, firma NOVOZYMES.

3.2 Použité přístroje

laboratorní váha EW 620, Kern
centrifuga Mikro 200, Hettichzentrifugen
vortex, lab Dance vario, Maneko
třepačka, inkubátor Helidolphunimax 1010, Labcom s.r.o.
UV/VIS spektrofotometr Helios ε, Unicam
pH metr Sensodirect 200, Lovibond

laminární box Aura mini, Bio Air Instruments

sestava HPLC/PDA/RI

- pumpa Thermo Scientific Ultimate 3000 Pump
- refraktometrický detektor RefraktoMax 520
- kolona Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%), 300 x 7,8 mm

3.3 Použité mikroorganismy

Na kultivaci se používaly kvasinky z České národní sbírky typových kultur - CNCTC. Na kultivaci se používaly *Saccharomyces cerevisiae* – kmeny 6646 a 6651.

3.4 Příprava roztoků

3.4.1 Carrezova činidla

Roztok I

10,6 g hexakynoželezitanu draselného doplnit v odměrné baňce destilovanou vodou na objem 100 ml

Roztok II

21,9 g octanu zinečnatého a 3 ml kyseliny octové doplnit v odměrné baňce destilovanou vodou na objem 100 ml

3.4.2 Somogyi-Nelsonova činidla

Roztok I

24 g bezvodého Na_2CO_3 , 16 g NaHCO_3 , 144 g bezvodého Na_2SO_4 , 12 g vinanu sodno-draselného, 800 ml destilované vody

Roztok II

4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 24 g bezvodého Na_2SO_4 , 200 ml destilované vody

Roztok III

25 g molybdenanu amonného v 450 ml destilované vody, 21 ml koncentrované H_2SO_4 , 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ v 25 ml destilované vody, roztok nechat stát 48 hodin při laboratorní teplotě

3.4.3 Ostatní roztoky

Folin-Ciocalteuovo činidlo

Zředit destilovanou vodou 1:9

Nasycený roztok Na_2CO_3

29,4 g Na_2CO_3 do 95 ml destilované vody

3.5 Materiál

Materiál, slupky a třapiny, pocházely z odrůdy Chardonnay sbírané ve vinařské oblasti Mikulov. Vylisovaný materiál k této práci poskytlo vinařství Zlomek & Vávra z Boršic u Blatnice.

3.5.1 Úpravy materiálu

3.5.1.1 Fyzikální úprava

Sušení – odstranění vody, která je odpařitelná (tzn. není navázaná ve struktuře vzorku). Sušení probíhá v sušárně do konstantní hmotnosti.

Mletí – jedná se o jednu z nejjednodušších úprav vzorku. Získal se jemný prášek, který měl částice menší než 0,05 mm. Materiál se rozmixoval v kuchyňském mixéru.

3.5.1.2 Chemická úprava

Hydrolýzou se rozumí rozkladná reakce, při které se spotřebovává voda. Molekuly jsou štěpeny přidávkou vody a vhodného katalyzátoru. Každý krok hydrolýzy spotřebovává jednu molekulu vody. V průběhu hydrolýzy se získává jeden fragment původní molekuly vodíkový iont vody a druhý hydroxylový iont vody [20] [21].

V práci byla aplikována chemická a enzymová hydrolýza za účelem rozložení odpadů z výroby vína, zejména celulózy. Chemická hydrolýza probíhá v kyselém prostředí kyseliny chlorovodíkové po dobu 15 minut v mikrovlnné troubě a po dobu 60 minut na vodní lázni. Celulóza se štěpí na kratší řetězce a monosacharidy, využitelné mikroorganismy.

Enzymatická hydrolýza probíhala v přítomnosti celulázového komplexu, který umožňuje provedení hydrolýzy za běžných podmínek. K materiálu slupek a třapin se přidal celulázový komplex (10% z celkového objemu substrátu). Materiál se nechal inkubovat na třepačce (140 RPM, 30 °C) po dobu 144 hodin.

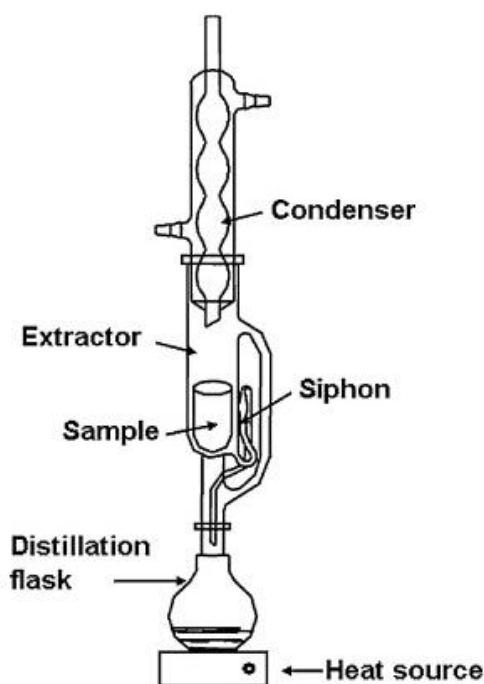
3.6 Stanovení sušiny

Sušina se stanovovala jak ve slupkách, tak ve třapinách.

Nejprve se zvážily suché misky, do kterých se navážil přibližně 1 g třapin a 1,3 g slupek s přesností na 4 desetinná místa. Misky se potom umístily do sušárny a sušily se při teplotě 90 °C do konstantní hmotnosti 4 dny. Po sušení misky vychladly v exsikátoru a zvážily se na analytických vahách.

3.7 Extrakce oleje

Navážilo se 15,5474 g slupek, ke kterým se přidalo 200 ml hexanu. Sestavila se aparatura podle Soxhleta a extrakce se nechala běžet 8 hodin.



Obrázek 8. Aparatura dle Soxhleta [22]

3.8 Stanovení celulózy

Nejprve se do 100 ml Erlenmeyerovy baňky navážilo 0,8 g třapin. Potom se přidalo 30 ml směsi kyseliny octové a kyseliny dusičné (80% kyselina octová:koncentrovaná kyselina dusičná = 10:1). Baňky se suspenzí se přikryly nálevkami a vložily do vodní lázně na 1 hodinu. Obsah Erlenmeyerových baněk se kvantitativně pomocí stříčky s ethanolem převedl do předem zvážených frit s velikostí pórů 15 μm (označení S4) a odfiltroval se. Filtrační koláč se na fritě promyl ethanolem a poté se fritu s materiálem sušila v sušárně při 105 °C minimálně 4 hodiny. Frity se vyjmuly a vložily do exsikátoru. Potom se frity zvažily na analytických vahách. Vzorky z frit se převedly pomocí špachtle do 100 ml Erlenmeyerových baněk a důkladně se kvantitativně vypláchly (do stejných baněk!) s použitím ethanolu. Ethanol se z baněk vypařil vodní lázní. Po důkladném odpaření ethanolu se do baněk přidalo 20 ml 72% kyseliny sírové a suspenze se nechaly 1 hodinu hydrolyzovat na třepačce při 30 °C, při otáčkách 100 ot./min. Hydrolyzát se kvantitativně převedl (opět pomocí ethanolu) na fritu s velikostí pórů 30 μm (označení S3) a odfiltroval. Frita se zbytkem vzorku se vložila do sušárny a usušila se stejně jako v předchozím případě.

3.9 Růst na substrátu

Z Petriho misek, které obsahovaly kultury kvasinek *S.cerevisiae*, se zaočkovalo minerální médium, které se nechalo 24 hodin třepat na třepačce (při 150 ot/min a při teplotě 30 °C). Po 24 hodinách se odebralo 10 % z minerálního média do produkčního média, které obsahovalo glukózu, třapiny nebo slupky. Tato produkční média se zase nechala 24 hodin na třepačce při stejných podmínkách a následně proběhlo měření biomasy – gravimetricky a opticky.

3.10 Stanovení sacharidů

3.10.1 Stanovení celkových sacharidů podle Duboise

Pro stanovení celkového množství sacharidů se využívá jejich rozkladu v silně kyselém prostředí. Přídavkem kyseliny sírové dojde ke štěpení polysacharidů a oligosacharidů na glukózu a následně v přebytku kyseliny k jejich dehydrataci na furfural. Následně dochází ke kondenzaci vzniklých derivátů s reakčním činidlem (např. fenol) za vzniku barevných kondenzačních produktů, které lze stanovit spektrofotometricky [23].

Ke stanovení se pipetovalo 1 ml vzorku, k němu se přidalo 1 ml 5% fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Směs se protřepala a nechala stát při laboratorní teplotě 30 minut. Změřila se absorbance kalibračních roztoků při 490 nm.

Slepý vzorek se připravil stejně, jen místo vzorku se do zkumavky dal 1 ml destilované vody.

Absorbance se proměřily 3x, pomocí programu Microsoft Excel se vypočetl průměr a z průměrných hodnot se sestrojila kalibrační přímka.

3.10.2 Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyiho-Nelsona

Redukující sacharidy jsou všechny monosacharidy obsahující volný poloacetalový hydroxyl (glukóza, fruktóza, ...).

K 1 ml roztoku vzorku se přidalo 0,5 ml roztoku I a 0,5 ml roztoku II (kapitola 3.4.2). Zkumavky se umístily na vroucí vodní lázeň na 10 min. Poté se ochladily vodou, přidalo se 0,5 ml roztoku III. Obsah ve zkumavkách se pořádně promíchal a destilovanou vodou se doplnil na objem 10 ml. Změřila se absorbance při 720 nm.

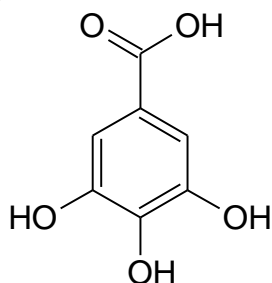
Slepý vzorek se připravil stejně, místo vzorku se do zkumavky pipetoval 1 ml destilované vody.

Absorbance se proměřily 3x, pomocí programu Microsoft Excel se vypočetl průměr a z průměrných hodnot se sestrojila kalibrační přímka.

3.11 Stanovení antioxidantů

3.11.1 Stanovení celkových polyfenolů

Standardním roztokem byla kyselina gallová.



Obrázek 6. Vzorec kyseliny gallové

Do zkumavky se pipetoval 1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla a 1 ml destilované vody. Přidalo se 50 μ l vzorku. Vzorek se promíchal a nechal stát 5 minut. Potom se přidalo

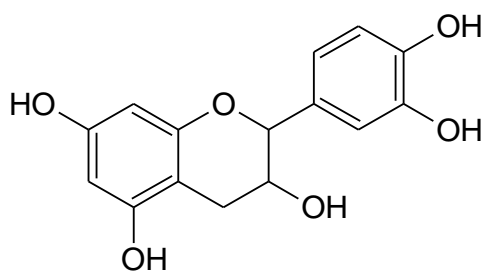
1,5 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Směs se promíchala a nechala stát 15 minut. Změřila se absorbance při 750 nm.

Slepý vzorek se připravil stejně, jen místo vzorku se do zkumavky dal 1 ml destilované vody.

Absorbance se proměřily 3x, pomocí programu Microsoft Excel se vypočetl průměr a z průměrných hodnot se sestrojila kalibrační přímka.

3.11.2 Stanovení celkových flavonoidů

Standardním roztokem byl katechin.



Obrázek 7. Vzorec katechinu

Do zkumavky se pipetovalo 0,5 ml vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml roztoku dusitanu sodného. Obsah ve zkumavkách se promíchal a nechal stát 5 minut. Následně se přidalo 0,2 ml chloridu hlinitého, obsah zkumavek se opět promíchal a nechal stát 5 minut. Potom se přidalo 1,5 ml hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Zkumavky se promíchaly a nechaly stát 15 minut

Změřila se absorbance kalibračních roztoků při 510 nm.

Slepý vzorek se připravil stejně, jen místo vzorku se do zkumavky dalo 0,5 ml destilované vody.

Absorbance se proměřily 3x, pomocí programu Microsoft Excel se vypočetl průměr a z průměrných hodnot se sestrojila kalibrační přímka.

3.12 Optimalizace množství substrátu

Optimalizace množství substrátu sloužilo k určení koncentrace substrátu pro hydrolýzu.

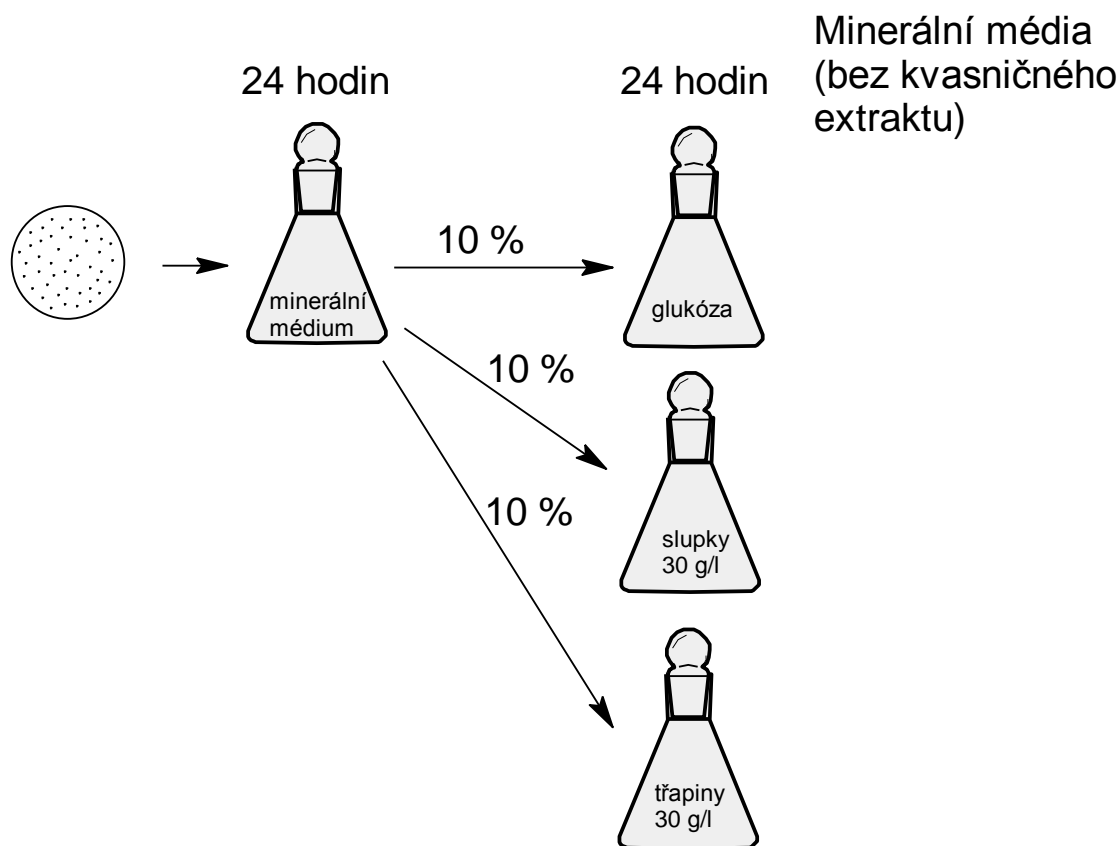
Připravilo se 100 ml inokula podle *Tabulky 1* s glukózou o koncentraci 30 g/l.

Tabulka 1. Příprava média

Voda	1000 ml
Kvasničný extrakt	4 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g

Inokulum se dalo sterilovat při teplotě 120 °C na 20 minut do autoklávu. Dále se připravila média (podle *Tabulky 1*) o koncentracích substrátu 30 g/l a 50 g/l. Poté se z inokula

(minerálního média) zaočkoval obsah v Erlenmeyerových baňkách v očkovacím boxu do produkčních médií – slupky, třapiny (viz *Obrázek 11*).



Obrázek 8. Kultivace na hroznových odpadech

Odebraly se vzorky před zaočkováním, hned po zaočkování, Erlenmeyerovy baňky se daly na třepačku (120 RPM, 30 °C) a poté se odebraly vzorky v následujících intervalech – po 5, 24, 29 a 48 hodinách. U všech vzorků se stanovil obsah redukujících sacharidů podle Somogyiho-Nelsona a ve vzorcích před zaočkováním a po 48 hodinách fermentace se stanovil obsah antioxidantů a ethanolu.

3.13 Hydrolýza

Vzorky slupek a třapin byly hydrolyzovány chemickou a enzymatickou hydrolýzou. U hydrolyzovaných vzorků se stanovily redukující sacharidy a celkové polyfenoly a flavonoidy, protože se předpokládalo, že se bude měnit jejich koncentrace.

3.13.1 Chemická hydrolýza

Pro chemickou hydrolýzu slupek a třapin byly použity 1,2 M kyselina chlorovodíková. Vzorky obsahovaly 10 g substrátu, použité médium se připravilo podle *Tabulky 1*, mělo koncentraci 50 g/l a objem 200 ml.

3.13.1.1 Chemická hydrolýza v mikrovlnné troubě

K navážkám do Erlenmeyerových baněk se přidalo 50 ml HCl a 50 ml ethanolu. Baňky se daly do mikrovlnné trouby (750 W) na 5 minut. Potom se baňky nechaly 10 minut stát a tento postup se ještě 2x zopakoval. Následně se provedla neutralizace na pH 5,5 pomocí 1 M roztoku hydroxidu sodného. Po neutralizaci se objem v baňkách doplnil vodou na 200 ml. Po 5 a 15 minutách se vždy odebraly vzorky, ve kterých se stanovily redukující sacharidy a antioxidanty. Potom se Erlenmeyerovy baňky vysterilovaly a zaočkovaly. Nakonec se odebraly vzorky před zaočkováním, hned po zaočkování a v následujících intervalech – po 7, 24, 48 a 144 hodinách.

3.13.1.2 Chemická hydrolýza na vodní lázni

K navážkám do Erlenmeyerových baněk se přidalo 50 ml HCl a 50 ml ethanolu. Baňky se daly na vodní lázeň na 1 hodinu. Po 30 minutách na vodní lázni se odebraly vzorky a baňky se daly zpět na lázeň. Na konci hydrolýzy, tj. po 60 minutách, se odebraly taktéž vzorky. V odebraných vzorcích se stanovily redukující sacharidy a antioxidanty. Potom se Erlenmeyerovy baňky vysterilovaly a zaočkovaly. Nakonec se odebraly vzorky před zaočkováním, hned po zaočkování a v následujících intervalech – po 7, 24, 48 a 144 hodinách.

3.13.2 Enzymatická hydrolýza

Připravila se média (podle *Tabulky 1*) o koncentraci 50 g/l a objemu 150 ml – inokulum, slupky, třapiny a glukóza – kontrola.

Erlenmeyerovy baňky se daly sterilovat na 1 hodinu, následně se v laminárním boxu odebraly vzorky před hydrolýzou, slupky, třapiny a glukóza se zaočkovaly z inokula, odebraly se vzorky hned po zaočkování a v potom v následujících intervalech – po 24, 48 a 144 hodinách.

3.14 HPLC

Připravila se řada kalibračních roztoků glukózy a ethanolu, roztoky se jednou proměřily na HPLC, vypočítala se plocha píků a nakonec se sestrojily kalibrační přímky (viz *Příloha 1.* a *Příloha 3.*).

Odebrané vzorky se vyčeřily pomocí Carrezových roztoků, centrifugovaly při 140 RPM po dobu 5 minut.

Jako mobilní fáze se použila deionizovaná voda. Vzorek o objemu 20 µl se analyzoval při průtoku 0,75 ml/min na koloně Rezex ROA-Organic Acid H+ (300 x 78 mm) 8%. Kolona se vyhřívala na 70 °C. Pro detekci se použil refraktometrický detektor.

4 VÝSLEDKY

4.1 Sušina

Obsah sušiny se vypočítal podle vztahu:

$$\%_{sušina} = \frac{(m_{miska+odpad} - m_{miska})}{m_{odpad}} \cdot 100,$$

kde: $m_{miska+odpad}$ - hmotnost misky a vzorku po vysušení.

Tabulka 2. Stanovení sušiny

	miska	m_{miska} [g]	m_{odpad} [g]	$m_{miska+odpad}$ [g]	sušina [%]	sušina _{průměr} [%]	směrodatná odchylka
třapiny	1	1,1778	1,0410	1,5182	32,70	31,72	2,128
	2	1,1738	1,1405	1,5019	28,77		
	3	1,1885	1,0114	1,5293	33,70		
slupky	4	1,1808	1,3182	1,7641	44,25	42,07	1,551
	5	1,1861	1,3119	1,7261	41,16		
	6	1,1855	1,3546	1,7380	40,79		

Obsah sušiny ve slupkách byl 42,07 % a ve třapinách 31,72 %. Pomocí programu MS EXCEL se pomocí funkce SMODCH vypočítala směrodatná odchylka naměřených hodnot.

4.2 Extrakce oleje

Tabulka 3. Extrakce oleje

$m_{navážka}$ [g]	15,5474
$m_{baňka}$ [g]	157,0745
$m_{baňka+olej}$ [g]	158,5974
m_{olej} [g]	1,5229

Následně se vyextrahované množství přepočítlo podle vztahu níže na procentuální vyjádření.

$$w_{\%} = \frac{(m_{baňka+olej} - m_{baňka})}{m_{navážka}} \cdot 100\% = \frac{158,5974 - 157,0745}{15,5474} \cdot 100\% = 9,80\%$$

Z výpočtu uvedeného výše lze vyčíst, že z 15,5474 g slupek se podařilo vyextrahovat 1,5229 g oleje, což po přepočtu činí 9,80 %.

4.3 Stanovení celulózy

Obsah celulózy se vypočítal podle vztahu:

$$\%_{hrubá\ celulóza} = \frac{(w_{frita\ S4+vzorek} - w_{frita\ S4})}{w_{vzorek}} \cdot 100$$

Tabulka 4. Stanovení celulózy

třapiny	m_{odpad} [g]	m_{fritaS4} [g]	m_{fritaS4+odpad} [g]	celulóza [%]	celulóza_{průměr} [%]	směrodatná odchylka
1	0,8008	25,6657	25,8081	17,78	17,20	0,839
2	0,8012	30,5644	30,6972	16,01		
3	0,7995	25,3376	25,4799	17,80		

Obsah celulózy ve třapinách se stanovil na 17,20 %. Pomocí programu MS EXCEL se pomocí funkce SMODCH vypočítala směrodatná odchylka naměřených hodnot.

4.4 Stanovení sacharidů

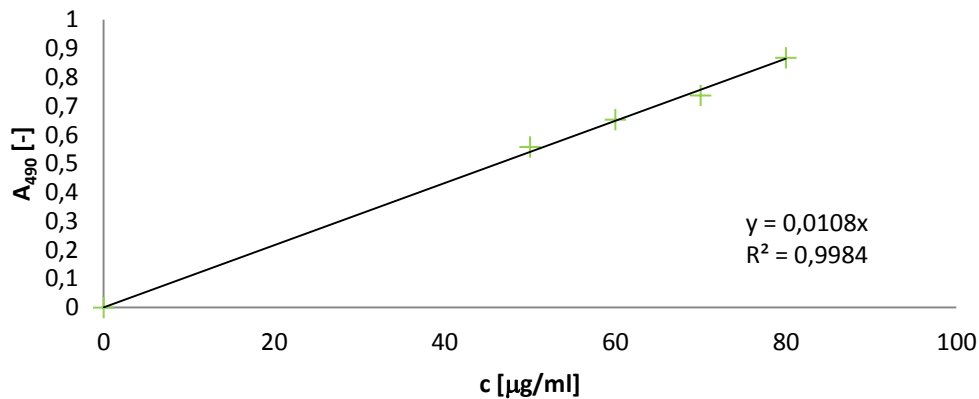
Obsah celkových i redukujících sacharidů se stanovoval ve slupkách i třapinách v médiu o koncentraci 30 g/l a objemu 400 ml. Odebrané vzorky se vyčěřily pomocí Carrezových roztoků – přidalo se 5% vypočítaných z objemů vzorku Carrezova roztoku I a následně za intenzivního třepání Carrezova roztoku II (kapitola 3.4.1). Vzorky se daly centrifugovat na 5 minut při 6 000 ot/min. Nakonec se vzorky naředily a stanovily se celkové (kapitola 3.10.1) i redukující sacharidy (kapitola 3.10.2)

4.4.1 Celkové sacharidy

Tabulka 5. Obsah celkových sacharidů v nehydrolyzovaném vzorku slupek a třapin

NEHYDROLYZOVANÝ VZOREK	slupky	třapiny
c_{SACH} [μg/ml]	5416,667	3790,123
c_{SACH} [g/l]	5,417	3,790
c_{SACH} [g/g]	0,181	0,126

Kalibrační přímka - celkové sacharidy



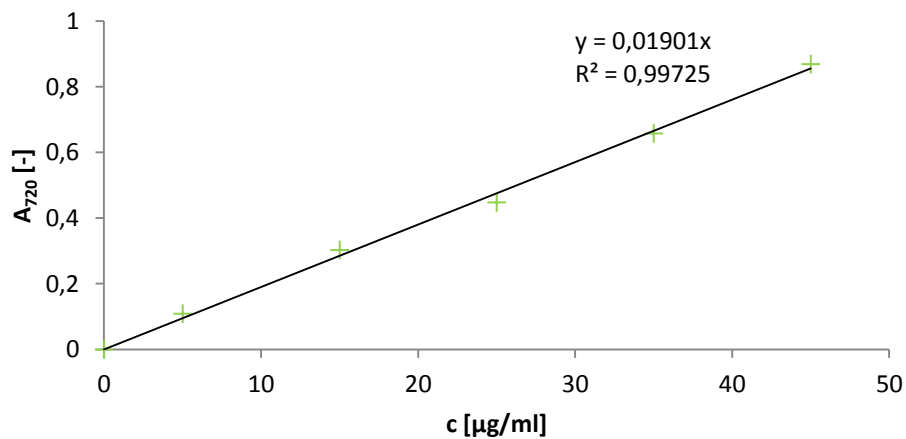
Graf 1. Kalibrační přímka - celkové sacharidy

4.4.2 Redukující sacharidy

Tabulka 6. Obsah redukujících sacharidů v nehydrolyzovaném vzorku slupek a třapin

NEHYDROLYZOVANÝ VZOREK	slupky	třapiny
c_{SACH} [µg/ml]	4595,827	3191,303
c_{SACH} [g/l]	4,596	3,191
c_{SACH} [g/g]	0,153	0,106

Kalibrační přímka - redukující sacharidy



Graf 2. Kalibrační přímka - redukující sacharidy

Z Tabulky 5 a z Tabulky 6 lze vyčíst, že obsah je vyšší u celkových sacharidů než redukujících. Koncentrace sacharidů u slupek se pohybovala v rozmezí 5,417 g/l – 4,596 g/l. Koncentrace u třapin byla v rozmezí 3,191 g/l – 3,790 g/l. Tento fakt je způsoben tím, že při stanovení celkových sacharidů se přidavkem kyseliny sírové rozštěpí oligosacharidy a polysacharidy, tudíž se stanoví všechny sacharidy přítomné ve vzorku. Na rozdíl u stanovení redukujících sacharidů, kde se stanoví pouze monosacharidy.

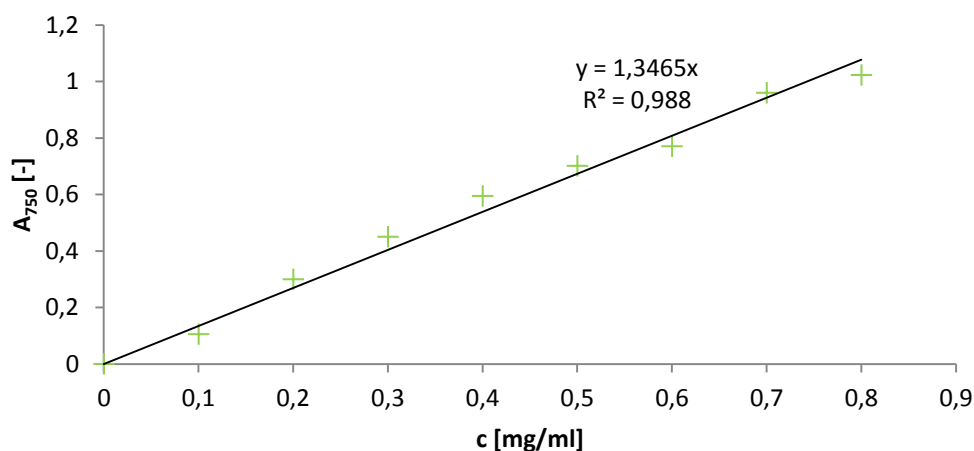
4.5 Stanovení antioxidantů

4.5.1 Polyfenoly

Tabulka 7. Obsah polyfenolů v nehydrolyzovaném vzorku slupek a třapin

NEHYDROLYZOVANÝ VZOREK	slupky	třapiny
c_P [mg/ml]	2,265	1,775

Kalibrační přímka - polyfenoly



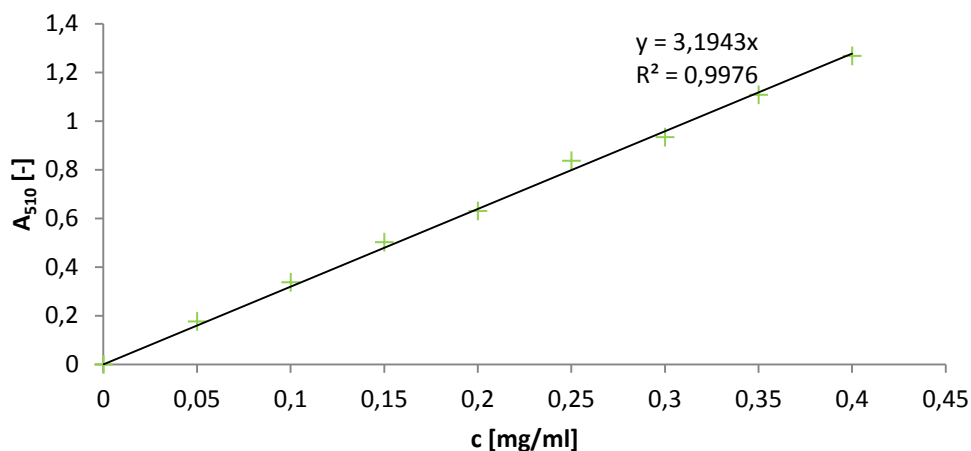
Graf 3. Kalibrační přímka – polyfenoly

4.5.2 Flavonoidy

Tabulka 8. Obsah flavonoidů v nehydrolyzovaném vzorku slupek a třapin

NEHYDROLYZOVANÝ VZOREK	slupky	třapiny
c_P [mg/ml]	1,320	0,773

Kalibrační přímka - flavoniody



Graf 4. Kalibrační přímka – flavoniody

4.6 Růst na substrátu

Tabulka 9. Stanovení biomasy gravimetricky (*s* – slupky, *t* – třapiny, *g* – glukóza)

vzorek	před	po	m_{biomasa} [g]	c [g/l]	rozdíl
46s	1,1819	1,2092	0,0273	2,73	1,41
46t	1,1893	1,2179	0,0286	2,86	1,54
46g	1,1911	1,2043	0,0132	1,32	
51s	1,1766	1,2030	0,0264	2,64	1,44
51t	1,1805	1,2079	0,0274	2,74	1,54
51g	1,1772	1,1892	0,0120	1,20	

Tabulka 10. Stanovení biomasy opticky (*s* – slupky, *t* – třapiny, *g* – glukóza)

	0 hodin	24 hodin	
vzorek	A_{630}	A_{630}	rozdíl (24-0)
46s	0,26	0,81	0,55
46t	0,34	0,98	0,64
46g	0,09	0,33	0,24
51s	0,23	0,77	0,54
51t	0,24	0,87	0,63
51g	0,04	0,41	0,37

Porovnání kultivace dvou různých kmenů kvasinek *S. cerevisiae* na různých substrátech je uvedeno v Tabulce 9. Oba kmeny prokazovaly větší vitalitu na substrátu z odpadních třapin, to může být způsobeno nižší koncentrací antioxidantů proti substrátu ze slupek hroznů. Pro

další kultivace byl použit kmen *S.cerevisiae* 6651. Tento kmen byl zvolen kvůli lepším technologickým vlastnostem.

4.7 Optimalizace množství substrátu

Optimalizace množství substrátu se provedla s koncentrací slupek a třapin 30 g/l a 50 g/l. U odebraných vzorků se stanovil obsah redukujících sacharidů metodou Somogyiho-Nelsona a v odběru po 48 hodinách kultivace obsah ethanolu pomocí HPLC.

Tabulka 11. Optimalizace množství substrátu – stanovení redukujících sacharidů metodou Somogyiho-Nelsona

		SLUPKY 30 g/l	SLUPKY 50 g/l	TŘAPINY 30 g/l	TŘAPINY 50 g/l
Před zaočkováním	CSACH [μg/ml]	3734,876	6491,320	3650,710	5817,991
	CSACH [g/l]	3,735	6,491	3,651	5,818
	CSACH [g/g]	0,124	0,130	0,122	0,116
Hned po zaočkování	CSACH [μg/ml]	6259,863	8942,662	5865,334	8784,850
	CSACH [g/l]	6,260	8,943	5,865	8,785
	CSACH [g/g]	0,209	0,179	0,196	0,176
Po 5 hodinách	CSACH [μg/ml]	6970,016	10336,665	7890,584	9626,512
	CSACH [g/l]	6,970	10,337	7,891	9,627
	CSACH [g/g]	0,232	0,207	0,263	0,193
Po 24 hodinách	CSACH [μg/ml]	799,579	852,183	636,507	1088,901
	CSACH [g/l]	0,800	0,852	0,637	1,089
	CSACH [g/g]	0,027	0,017	0,021	0,022
Po 29 hodinách	CSACH [μg/ml]	510,258	631,247	573,382	1002,104
	CSACH [g/l]	0,510	0,631	0,573	1,002
	CSACH [g/g]	0,017	0,013	0,019	0,020
Po 48 hodinách	CSACH [μg/ml]	15,781	457,654	647,028	1057,338
	CSACH [g/l]	0,016	0,458	0,647	1,057
	CSACH [g/g]	0,0005	0,0092	0,0216	0,0211
	CEtOH [g/l]	1,921	3,489	1,698	2,473

Koncentrace redukujících sacharidů se pohybovala v rozmezí 0,016 g/l až 10,337 g/l, přičemž nejnižší hodnota patří vzorku kultivovanému na slupkách o koncentraci 30 g/l v čase 48 hodin a nevyšší taktéž kultivaci na slupkách, avšak o koncentraci 50 g/l a po 5 hodinách kultivace.

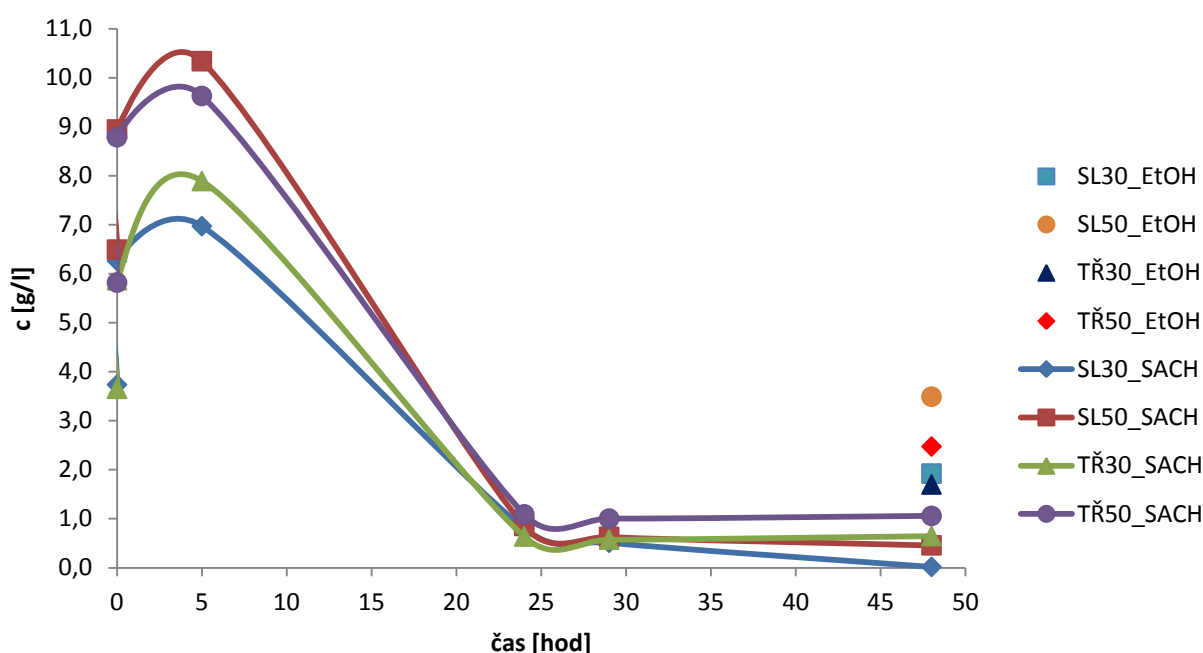
Ethanol se podařilo stanovit pouze po 48 hodinách kultivace. Koncentrace ethanolu se pohybovala v rozmezí 1,698 g/l až 3,489 g/l. Nejvíce ethanolu se podařilo detekovat v kultivaci na slupkách o koncentraci 50 g/l a nejméně ethanolu obsahovalo médium s třapinami o koncentraci 30 g/l.

Z Grafu 5 lze vidět, že nejnižší koncentrace substrátů byla na konci kultivace, tj. po 48 hodinách. Naopak nejvyšší nárůst koncentrace substrátů byla po 5 hodinové kultivaci.

Z Grafu 5 lze taktéž vyčíst, že nejvyšší koncentrace redukujících sacharidů měly slupky i třápiny o výchozím množství 50 g/l, po 5 hodinách kultivace měly úplně nejvyšší koncentraci slupky o 50 g/l. Na konci fermentace, tj. po 48 hodinách, byly nejméně koncentrované redukující cukry v médiu obsahujícím slupky 30 g/l a největší koncentraci měly redukující cukry v médiu s třápinami 50 g/l.

Přehled koncentrací redukujících sacharidů shrnuje *Tabulka 11*.

Optimalizace množství substrátu



Graf 5. Optimalizace množství substrátu - graf závislosti koncentrace redukujících sacharidů a ethanolu (po 48 hodinách kultivace) substrátů na času kultivace.

Tabulka 12. Optimalizace množství substrátu - stanovení polyfenolů a flavonoidů

			SLUPKY 30 g/l	SLUPKY 50 g/l	TŘÁPINY 30 g/l	TŘÁPINY 50 g/l
POLY- FENOLY	Před zaočkováním	c_P [mg/ml]	0,743	1,857	0,520	0,891
		c_P [g/g]	0,025	0,037	0,017	0,018
	Po 48 hodinách	c_P [mg/ml]	0,446	1,782	0,668	0,594
		c_P [g/g]	0,015	0,059	0,022	0,020
FLAVO- NOIDY	Před zaočkováním	c_F [mg/ml]	0,877	1,409	0,438	0,595
		c_F [g/g]	0,029	0,047	0,015	0,020
	Po 48 hodinách	c_F [mg/ml]	1,002	1,096	0,438	0,689
		c_F [g/g]	0,033	0,037	0,015	0,023

Antioxidanty se stanovily ve vzorcích před zaočkováním a na konci fermentace, tj. po 48 hodinách. Nejmenší koncentrace polyfenolů byla nalezena v médiu s obsahem slupek 30

g/l (0,446 mg/ml) po 48 hodinách. Nejvyšší koncentrace polyfenolů vyšla v médiu s obsahem slupek 50 g/l (1,857 mg/ml) před zaočkováním.

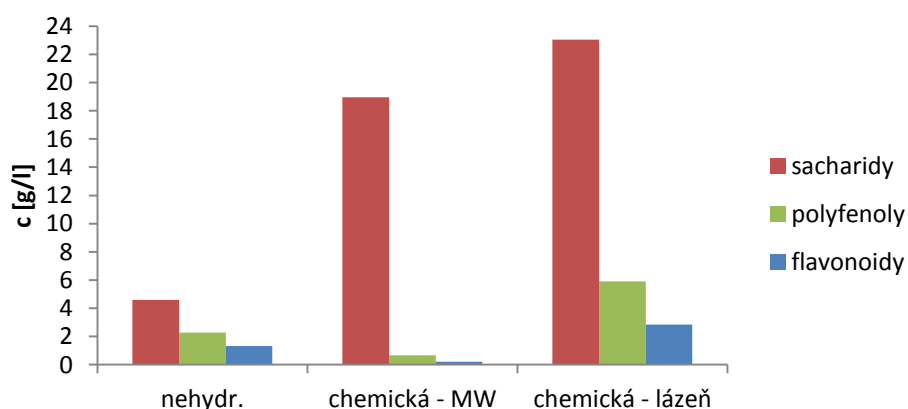
Shodný, a zároveň nejmenší obsah flavonoidů vyšel v médiu s obsahem třapin 30 g/l (0,438 mg/ml). Nejvyšší koncentraci flavonoidů mělo v médiu s obsahem slupek 50 g/l (1,409 mg/ml).

4.8 Hydrolýza

Tabulka 13. Stanovení koncentrace redukujících sacharidů metodou Somogyiho-Nelsona a antioxidantů ve vzorcích před hydrolýzou a v chemicky hydrolyzovaných vzorcích (v mikrovlnné troubě a na vodní lázni)

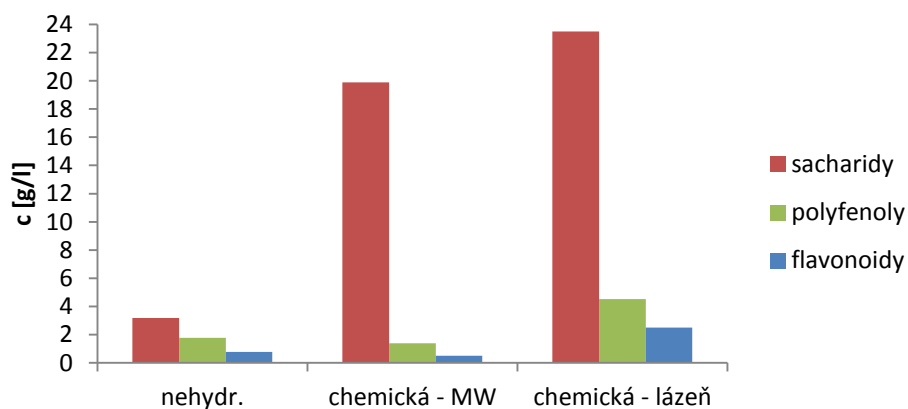
	vzorek	c [g/l]	
		slupky	třapiny
Sacharidy	Nehydrolyzovaný	4,596	3,191
	Chem. hydr. – MW	18,964	19,884
	Chem. hydr. – lázeň	23,041	23,488
Polyfenoly	Nehydrolyzovaný	2,265	1,775
	Chem. hydr. – MW	0,668	1,396
	Chem. hydr. – lázeň	5,904	4,530
Flavonoidy	Nehydrolyzovaný	1,320	0,773
	Chem. hydr. – MW	0,203	0,501
	Chem. hydr. – lázeň	2,836	2,498

Obsah sacharidů a antioxidantů ve slupkách



Graf 6. Srovnání koncentrací slupek nehydrolyzovaného vzorku, po chemické hydrolýze v mikrovlnné troubě a na vodní lázni

Obsah sacharidů a antioxidantů v třapinách



Graf 7. Srovnání koncentrací třapin nehydrolyzovaného vzorku, po chemické hydrolyze v mikrovlnné troubě a na vodní lázni

V Tabulce 13, ale i v Grafu 6 a 7 lze vidět, že nejnižší koncentrace redukujících sacharidů v médiu s obsahem slupek i třapin byla v nehydrolyzovaném vzorku a nejvyšší u vzorků hydrolyzovaných na vodní lázni. Tento fakt je dán tím, že hydrolyzou dochází ke štěpení celulózy, tudíž obsah sacharidů je vyšší. Z měření vyšlo najevo, že chemická hydrolyza na vodní lázni je lepší, než chemická hydrolyza v mikrovlnné troubě.

Obsah antioxidantů je v médiu s obsahem slupek i třapin vyšší po chemické hydrolyze, která probíhala na vodní lázni. Tuto skutečnost vysvětluje fakt, že při působení mikrovln byly vzorky vystaveny agresivnějšímu prostředí a tím pádem došlo pravděpodobně k rozkladu těchto látek.

Tabulka 14. Obsah redukujících sacharidů stanovených metodou Somogyiho-Nelsona v hydrolyzovaných vzorcích

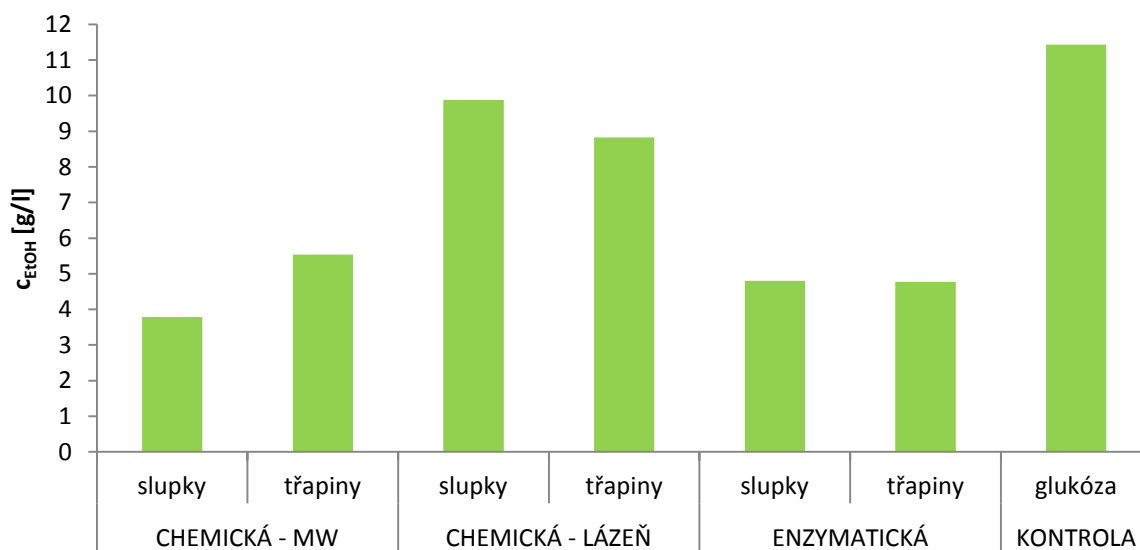
		chemická hydrolýza - MW		chemická hydrolýza – vodní lázeň		kontrola	enzymatická hydrolýza		kontrola
		slupky	třapiny	slupky	třapiny	glukóza	slupky	třapiny	glukóza
před zaočk.	c [g/l]	18,964	19,884	23,041	23,488	50,000	10,442	10,679	51,710
0 hodin	c [g/l]	23,956	23,321	27,496	27,548	54,032	14,650	14,992	54,605
7 hodin	c [g/l]	14,624	13,098	16,070	16,912	45,555	8,523	7,645	48,654
24 hodin	c [g/l]	1,741	1,078	4,897	1,194	0,279	1,804	2,173	41,084
48 hodin	c [g/l]	1,323	0,892	1,168	1,944	0,231	1,299	1,657	18,832
144 hodin	c [g/l]	1,641	1,194	1,262	1,010	0,244	1,468	2,036	2,073

4.9 Sledování produkce metabolitů metodou HPLC

Na růst a produkci mikroorganismů má vliv koncentrace sacharidů a polyfenolických látek v prostředí. Pro fermentaci byly použity kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Ty produkují ethanol a spotřebovávají glukózu.

Slupky a třapiny, o koncentraci 50 g/l hydrolyzovány chemicky kyselinou chlorovodíkovou v mikrovlnné troubě a na vodní lázni a enzymaticky celulázou, sloužily jako produkční média pro kultivaci *Saccharomyces cerevisiae*. Cílem kultivace byla produkce ethanolu, která se monitorovala pomocí HPLC/PDA/RI zároveň s úbytkem koncentrace glukózy.

Koncentrace ethanolu v hydrolyzovaných vzorcích

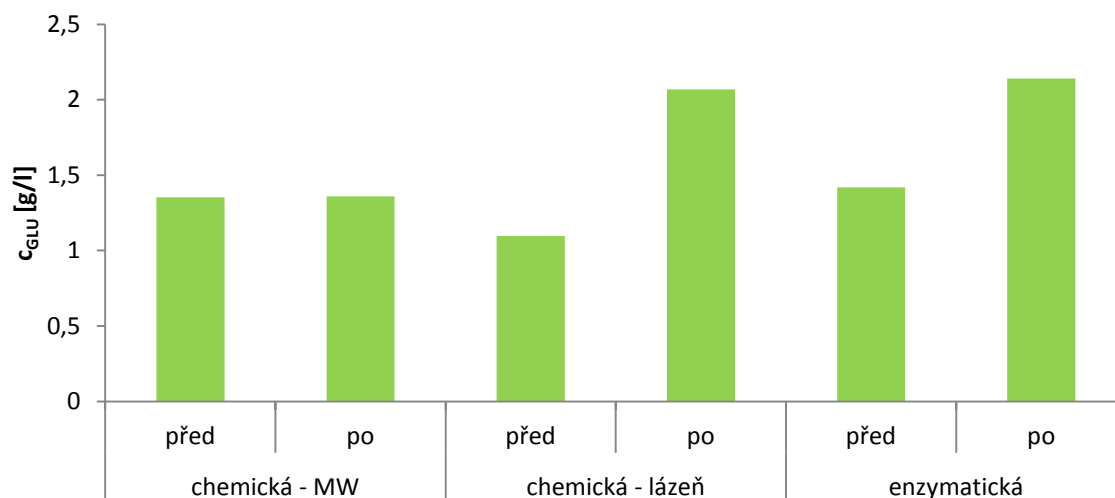


Graf 8. Koncentrace ethanolu (stanovená pomocí HPLC) ve slupkách a třapinách v chemicky a enzymaticky hydrolyzovaných vzorcích po 48 hodinách kultivace

Z Grafu 8 lze vyčíst, že nejmenší koncentraci ethanolu po 48 hodinách kultivace měly vzorky, které byly hydrolyzovány enzymem (4,776 g/l – 4,799 g/l). Tento fakt byl způsoben tím, že celulózy jsou inhibované glukózou (na začátku kultivace zůstává glukóza v aktivním místě enzymu) a taky proto, že je ve vzorcích vyšší obsah polyfenolů a flavonoidů, které brzdí růst.

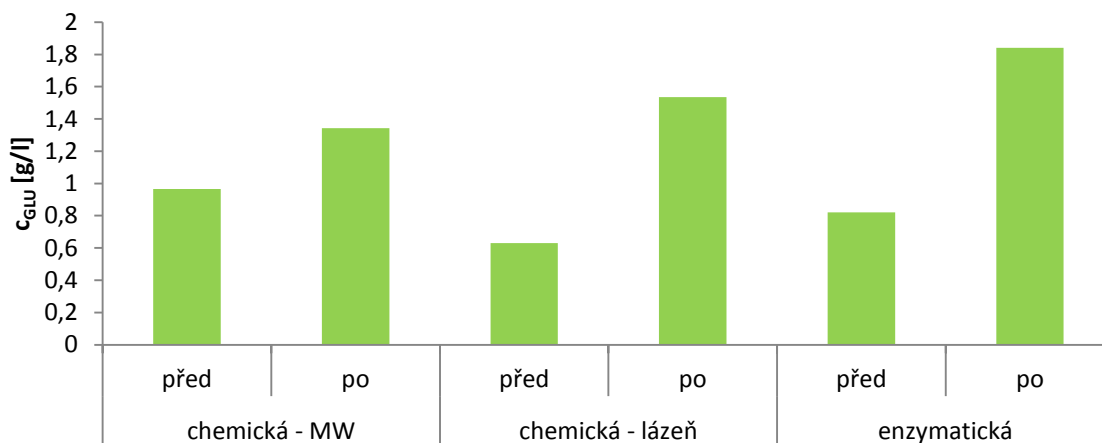
Koncentrace glukózy u kontrolního vzorku po 48 hodinách byla 5,252 g/l. V ostatních vzorcích se glukóza nepodařila detekovat.

Obsah glukózy ve slupkách na začátku a na konci hydrolýz



Graf 9. Koncentrace glukózy stanovené pomocí HPLC ve slupkách na začátku a na konci chemické a enzymatické hydrolýzy

Obsah glukózy ve třepinách na začátku a na konci hydrolýz



Graf 10. Koncentrace glukózy stanovené pomocí HPLC ve slupkách na začátku a na konci enzymatické hydrolýzy

V Grafu 9 a Grafu 10 je vidět, jak se koncentrace glukózy na konci každé hydrolýzy zvýšila. Vzorky se podrobily chemické a enzymatické hydrolýze. Chemická hydrolýza probíhala v přítomnosti HCl a to dvěma způsoby – v mikrovlnné troubě po dobu 15 minut a na vodní lázni 60 minut. Enzymaticky hydrolyzované vzorky se nechaly 24 hodin na třepačce při teplotě 40 °C.

Nejvyšší koncentrace glukózy ve slupkách se detekovala na konci enzymatické hydrolýzy (2,140 g/l) a nejmenší koncentraci glukózy obsahoval vzorek hydrolyzovaný

chemicky v mikrovlnné troubě (1,360 g/l). Ve třapínách obsahoval nejvyšší koncentraci glukózy taktéž vzorek na konci enzymatické hydrolýzy (1,840 g/l) a nejmenší koncentraci taky vzorek hydrolyzovaný chemicky v mikrovlnné troubě (1,342 g/l).

5 ZÁVĚRY

Bakalářská práce se věnovala zpracování odpadu při výrobě vína. Práce je rozdělena na tři části. V první části je provedena kompoziční analýza slupek a třapin, jako stanovení sušiny, celulózy a extrakce oleje. Druhá část práce se zabývá hydrolýzou odpadu, a to chemickou v mikrovlnné troubě a na vodní lázni a enzymatickou. U připravených hydrolyzátů se stanovil spektrofotometricky obsah redukujících sacharidů, polyfenolů a flavonoidů. Třetí část se věnuje využití hydrolyzovaných vzorků pro fermentační proces. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* byla kultivována na hydrolyzátech odpadů. Nakonec se gravimetricky stanovila biomasa a pomocí HPLC/PDA/RI se monitorovala změna koncentrace glukózy a produkce ethanolu.

V rámci kompoziční analýzy se stanovila sušina, která vyšla vyšší ve slupkách, a to 42,07 %, v třapinách sušina činila 31,71 %. Následovala extrakce oleje ze slupek pomocí hexanu v aparatuře podle Soxhleeta. Vyextrahovalo se 1,5229 g oleje, což je 9,80 %. Nakonec se stanovil obsah celulózy za působení kyselin ve třapinách na 17,20 %.

Kultivace byla prováděna se dvěma různými kmeny kvasinek *S. cerevisiae*, lepší výsledky byly dosaženy s kmenem *S. cerevisiae* 6651. Růst probíhal lépe na třapinách, což je způsobeno zřejmě nižším obsahem antioxidantů ve třapinách než ve slupkách. Antioxidanty brzdí růst. Optimalizace množství substrátu se prováděla se dvěma různými koncentracemi odpadního substrátu – 30 g/l a 50 g/l. U odebraných vzorků se stanovily redukující sacharidy metodou Somogyiho-Nelsona a antioxidanty (polyfenoly a flavonoidy). Polyfenoly a flavonoidy působí nepříznivě na růst mikroorganismů, což bylo opakovaně patrné při fermentaci slupek, které mají vyšší obsah antioxidantů než třapiny.

U chemické hydrolýzy odpadů (koncentrace substrátu 50 g/l) za působení kyseliny chlorovodíkové a methanolu bylo lepších výsledků dosaženo, když se vzorky daly na vodní lázeň, než když byly v mikrovlnné troubě. Tento fakt byl způsoben tím, že mikrovlny byly pro vzorky agresivnějším prostředím, takže se zničilo více antioxidantů. Nejvyšší koncentraci redukujících sacharidů měly třapiny hned po hydrolýze, před zaočkováním ($c = 23,488$ g/l). Nejnižší koncentraci redukujících cukrů měly taktéž třapiny hydrolyzované chemicky na vodní lázni, ale po 144 hodinách kultivace ($c = 1,010$ g/l).

Enzymatickou hydrolýzou pomocí enzymu celulózy (koncentrace substrátu 50 g/l) byl stanoven nejvyšší obsah redukujících sacharidů ve vzorku třapin hned po zaočkování ($c = 14,992$ g/l). Nejmenší koncentraci redukujících sacharidů měly slupky v čase 144 hodin ($c = 1,468$ g/l). Ze srovnání je patrné, že chemickou hydrolýzou bylo z materiálu uvolněno asi o 70% více redukujících cukrů než enzymovou hydrolýzou. Chemicky připravené hydrolyzáty jsou mikroorganismem i lépe využívány.

Pro kultivaci kvasinek *S. cerevisiae* se jako substrát používaly slupky a třapiny o koncentraci 50 g/l. Nejlepší výsledky produkované koncentrace ethanolu byly dosaženy v médiu

obsahujícím slupky podrobené chemické hydrolýze na vodní lázni, a to po 48 hodinách kultivace na slupkách ($c = 9,880 \text{ g/l}$) oproti kontrole ($c = 11,433 \text{ g/l}$).

Pro další práci by bylo vhodné dále optimalizovat množství použitého substrátu. Zároveň se jeví jako technologicky nevýhodný krok dělení substrátu na slupky a třapiny. Oba tyto substráty totiž poskytují podobné konečné výsledky, a tedy by bylo možné použít jejich směs.

Přirozené složky odpadů ze zpracování hroznů mohou být využity nejen jako substrát pro fermentace, ale i jako zdroj antioxidantů, oleje, sacharidů a dalších složek pro aplikace v kosmetice i potravinářství.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] STEIDL, Robert. *Sklepní hospodářství*. V českém jazyce vyd. 1. Valtice: Národní salon vín, 2002, 307 s. ISBN 80-903-2010-4.
- [2] KRAUS, Vilém. *Nová encyklopedie českého a moravského vína*. Praha: Praga Mystica, 2005-2008, 2 v. ISBN 97880867670932.
- [3] Encyklopedie termínů [cit. 2014-04-23] Dostupné online z: <http://www.znalecvin.cz/>
- [4] CASAZZA, ALESSANDRO A., BAHAR ALIAKBARIAN, DANILO DE FAVERI, LUCA FIORI a PATRIZIA PEREGO. ANTIOXIDANTS FROM WINEMAKING WASTES: A STUDY ON EXTRACTION PARAMETERS USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. *Journal of Food Biochemistry* [online]. 2012, vol. 36, issue 1, s. 28-37 [cit. 2014-04-23]. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2010.00511.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-4514.2010.00511.x>
- [5] PASSOS, Cláudia P., Rui M. SILVA, Francisco A. DA SILVA, Manuel A. COIMBRA a Carlos M. SILVA. Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2010, **160**(2): 634-640 [cit. 2015-05-19]. DOI: 10.1016/j.cej.2010.03.087. ISSN 13858947. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894710003232>
- [6] Simbinatur. *Simbinatur* [online]. [cit. 2015-03-19]. Dostupné z: <http://www.symbinator.com/Znate-moucku-z-hroznovych-jader-clanek-1987.html>
- [7] ROSALES SOTO, Maria U., Kelsie BROWN a Carolyn F. ROSS. Antioxidant activity and consumer acceptance of grape seed flour-containing food products. *International Journal of Food Science* [online]. 2012, vol. 47, issue 3, s. 592-602 [cit. 2014-04-23]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02882.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2011.02882.x>
- [8] Wine Wellness. *Wine Wellness* [online]. 2011 [cit. 2015-05-19]. Dostupné z: <http://www.winewellness.cz/>
- [9] DOLEŽAL, Petr. Lexikon moravského vinařství: historie a současnost pěstování vinné révy na Moravě. Nový Bydžov: Petr Iva, 2001. ISBN 80-902748-2-X.
- [10] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 96 s. ISBN 80-247-1247-4.

- [11] Složení hroznů. In: [online]. [cit. 2015-04-04]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1269
- [12] KRAUS, Vilém, Vítězslav HUBÁČEK a Petr ACKERMANN. *Rukověť vinaře*. Vyd. 1. Praha: Brázda, 2000, 262 s., [12] s. barev. obr. příl. ISBN 80-853-6234-1.
- [13] Foto: Martin Halík, zařízení sklepa Vinařství ZLOMEK & VÁVRA.
- [14] GLAMPEDAKI, Pelagia a Victoria DUTSCHK. Stability studies of cosmetic emulsions prepared from natural products such as wine, grape seed oil and mastic resin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014, vol. 460, s. 306-311. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2014.02.048. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775714001964>
- [15] ŠÍPAL, Zdeněk, Pavel ANZENBACHER, Pavel PEČ, Jiří POSPÍŠIL a Ivan RŮŽIČKA. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1992, 479 s. Učebnice pro vysoké školy. ISBN 80-042-1736-2
- [16] ČEGAN, A., KORECKÁ, J.: *Biochemie pro bakalářské studium chemie a technické chemie*. Skriptum. 2008. Pardubice: Fakulta chemicko-technologická, 61 s.
- [17] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin II. Rozš. a přeprac.* 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [18] Konzervační látky. In: [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: <https://www.syncare.cz/konzervacni-latky>
- [19] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [20] MCMURRY, John. *Organická chemie*. Vyd. 1. V Brně: VUTIUM, 2007, xxv, 1176, 61, 31 s. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.
- [21] GARGAUD, Muriel a R AMILS. Encyclopedia of astrobiology [online]. Berlin: Springer, 2011, 3 v. [cit. 2014-04-12]. ISBN 9783642112713. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=oEq1y9GIcr0C&pg=PA785&dq=Encyclopedia+of+Astrobiology,++hydrolysis&hl=cs&sa=X&ei=0JcU4eUA4OBywO6mYKAAG&ved=0CDIQ6AEwAA#v=onepage&q=Encyclopedia%20of%20Astrobiology%2C%20%20hydrolysis&f=false>
- [22] LUQUE DE CASTRO, M.D. a F. PRIEGO-CAPOTE. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, 1217(16): 2383-2389 [cit.

2015-05-19]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.027. ISSN 00219673. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309016884>

[23] Čopíková, J.: *Chemie a analytika sacharidů*, Praha, VŠCHT, 1997

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
p.a.	for analysis, chemikálie pro analytické účely
UV	ultraviolet, ultrafialové
VIS	visible, viditelný
SACH	sacharidy
P	polyfenoly
F	flavonoidy
s	slupky
t	třapiny
g	glukóza
EtOH	ethanol
nehydr.	nehydrolyzovaný
MW	mikrovlnná trouba
lázeň	vodní lázeň

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1. Koncentrace standardů a plochy píků glukózy

Příloha 2. Kalibrační přímka - glukóza

Příloha 3. Koncentrace standardů a plochy píků ethanolu

Příloha 4. Kalibrační přímka - ethanol

Příloha 5. Chromatogram pro standard ethanolu o koncentraci 8 g/l s retenčním časem 17,968 minut

Příloha 6. Chromatogram pro standard glukózy o koncentraci 6,4 g/l s retenčním časem 8,300 minut

Příloha 7. Chromatogram pro chemicky hydrolyzovaný vzorek na vodní lázni, odebraný v čase 24 hodin, na grafu je pík glukózy s retenčním časem 8,292 minut a pík ethanolu s retenčním časem 17,972 minut

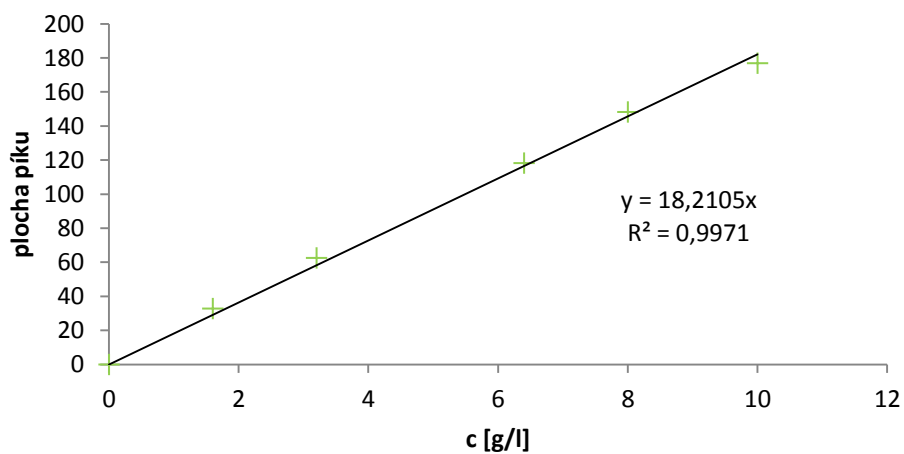
9 PŘÍLOHY

Příloha 1. Koncentrace standardů a plochy píků glukózy

c [g/l]	plocha píku
0	0
10	176,93
8	148,30
6,4	118,276
3,2	62,588
1,6	32,854

Příloha 2. Kalibrační přímka - glukóza

Kalibrační přímka - glukóza

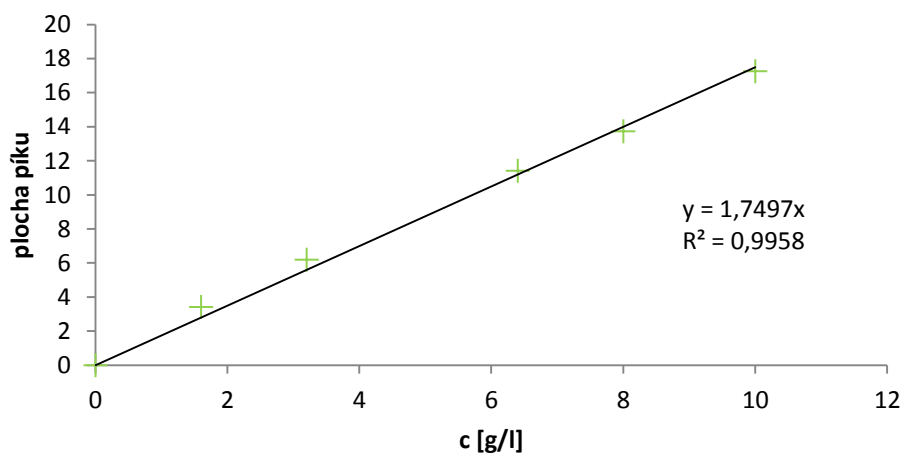


Příloha 3. Koncentrace standardů a plochy píků ethanolu

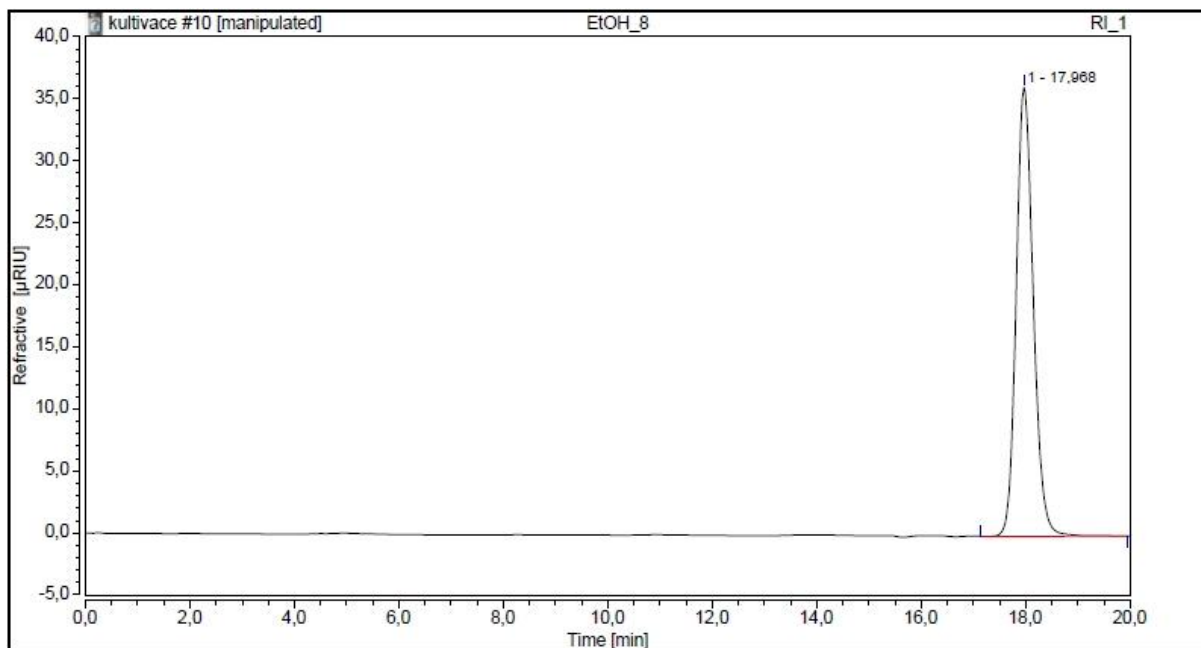
c [g/l]	plocha píku
0	0
10	17,267
8	13,740
6,4	11,423
3,2	6,200
1,6	3,421

Příloha 4. Kalibrační přímka - ethanol

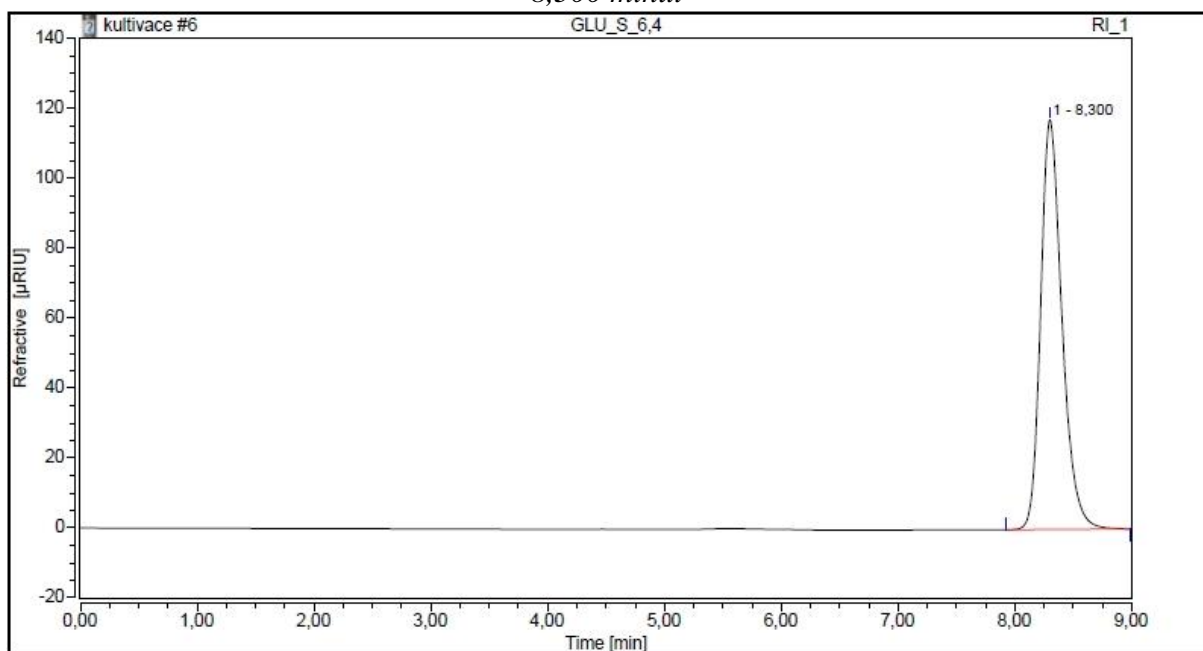
Kalibrační přímka - ethanol



Příloha 5. Chromatogram pro standard ethanolu o koncentraci 8 g/l s retenčním časem 17,968 minut



Příloha 6. Chromatogram pro standard glukózy o koncentraci 6,4 g/l s retenčním časem 8,300 minut



Příloha 7. Chromatogram pro chemicky hydrolyzovaný vzorek na vodní lázni, odebraný v čase 24 hodin, na grafu je pík glukózy s retenčním časem 8,292 minut a pík ethanolu s retenčním časem 17,972 minut

